

Neuronale Plastizität in Tiermodellen für neuropsychiatrische Erkrankungen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften, Dr. rer. nat.,

genehmigte Dissertation von

M. Sc. Linda Reimers

geboren am 03.10.1980 in Rinteln

Referentin: Apl. Prof. Dr. rer. nat. Manuela Gernert

Korreferentin: Prof. Kerstin Schwabe (W2, PhD)

Tag der Promotion: 31.07.2014

für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	x
Abbildungsverzeichnis	xiii
Tabellenverzeichnis.....	xvi
1. Einführung	1
2. Einleitung	3
2.1 Schizophrenie	3
2.1.1 Definition und Terminologie	3
2.1.3 Epidemiologie	4
2.1.4 Ätiopathogenese	4
2.1.5 Symptomatik	6
2.1.6 Klinischer Verlauf	8
2.1.7 Diagnose und Differentialdiagnose	10
2.1.8 Mit einer Schizophrenie assoziierte biochemische und neuroanatomische Veränderungen	11
2.1.9 Therapeutische Maßnahmen.....	17
2.1.9.1 Pharmakotherapie mit Risperidon	20
2.2 Präklinische Tiermodelle der Schizophrenie	21
2.2.1 Psychostimulans-basierte Modelle der Schizophrenie	21
2.2.1.1 Pharmakologische Induktion Schizophrenie-typischer Symptome mittels Amphetamin-Applikation	21
2.2.1.2 Pharmakologische Induktion Schizophrenie-typischer Symptome mittels Quinpirol-Applikation	23
2.2.2 Neuroentwicklungsbiologische Modelle der Schizophrenie	25
2.2.2.1 Neurotoxische Induktion Schizophrenie-typischer Symptome mittels Methylazoxymethanolacetat-Exposition <i>in utero</i>	25
2.2.2.2 Immunologische Induktion Schizophrenie-typischer Symptome mittels pränataler Poly I:C-Behandlung.....	27
2.2.3 Genetische Induktion Schizophrenie-typischer Symptome mittels Expression des mutierten humanen <i>DISC1</i> -Gens (disrupted-in-schizophrenia-1)	29
2.3 Exkurs zu Morbus Alzheimer	33
2.3.1 Morbus Alzheimer - Ein allgemeiner Überblick.....	33
2.3.2 Das präklinische APPSWE-Mausmodell des Morbus Alzheimer.....	35
2.4 Synaptische Dornfortsätze	37
2.4.1 Aufbau und Morphologie synaptischer Dornfortsätze	37
2.4.2 Funktion synaptischer Dornfortsätze.....	40

2.4.3 Pathologische Alterationen der synaptischen Dornfortsätze bei Schizophrenie.....	41
2.4.4 Pathologische Alterationen der synaptischen Dornfortsätze bei Morbus Alzheimer	43
2.5 Methodische Einführung	45
2.5.1 Ballistische Fluoreszenzmarkierung einzelner Nervenzellen via Genkanone.....	45
2.5.2 Die Gene Gun-Technik in Gegenüberstellung zur Golgi-Cox-Färbung.....	47
3. Zielsetzungen dieser Dissertation.....	49
4. Material und Methoden	51
4.1 Tierexperimentelle Arbeiten	51
4.1.1 Die Versuchstiere	51
4.1.1.1 Das präklinische Tiermodell des Morbus Alzheimer	51
4.1.1.2 Die präklinischen Tiermodelle der Schizophrenie	51
4.1.1.2.1 Das Amphetamin- und Quinpirol-Modell.....	51
4.1.1.2.2 Das <i>DISC1</i> -Modell	52
4.1.1.2.3 Das MAM-Modell	52
4.1.1.2.4 Das Poly I:C-Modell	53
4.1.2 Experimentelles Design	53
4.1.2.1 Das Versuchsdesign der Amphetamin-Studie.....	53
4.1.2.2 Das Versuchsdesign der Quinpirol-Studie.....	55
4.1.2.3 Das Versuchsdesign der Poly I:C-Studie.....	57
4.1.3 Der Open Field-Test.....	59
4.2 Histologisch Arbeiten.....	62
4.2.1 Die transkardiale Perfusion.....	62
4.2.2 Die Anfertigung der Gehirnschnitte	63
4.2.3 Immunhistochemische Markierung Parvalbumin-positiver Interneurone.....	63
4.2.4 Histologische Quantifizierung PV ⁺ Interneuronpopulationen verschiedener Gehirnareale	65
4.3 Untersuchung der synaptischen Dornfortsätze und der dendritischen Komplexität.....	67
4.3.1 Die Herstellung der mikrocarrierhaltigen Gene Gun-Patronen	67
4.3.2 Die diolistische Fluoreszenzmarkierung.....	68
4.3.3 Die Anfertigung konfokaler Bildaufnahmen für die Spine-Analyse	71
4.3.4 Die Anfertigung konfokaler Bildaufnahmen für die Sholl-Analyse	74
4.3.5 Die Sholl-Analyse	75
4.4 Statistik.....	78
4.5 Aufstellung der für sämtliche Methoden benötigten Materialien, Substanzen und Geräte sowie der verwendeten Computerprogramme	79

5. Ergebnisse	82
5.1 Vergleich der konfokalen Laser Scanning Mikroskope LSM 510 Meta und LSM 700 (Carl Zeiss)	82
5.2 Quantitative und morphologische Analyse synaptischer Dornfortsätze	83
5.2.1 Morphologische Klassifikation synaptischer Dornfortsätze	83
5.2.2 Die manuelle 3D-Spine-Analyse	84
5.2.3 Die automatische Spine-Analyse mittels Definiens Architect XD-Software	85
5.3 Etablierung einer optimierten Methode zur Quantifizierung synaptischer Dornfortsätze im Vorderhirn von Mäusen	92
5.3.1 Quantifizierung und Klassifizierung synaptischer Dornfortsätze in acht Monate alten APPSWE-Mäusen: Golgi Cox-Färbung vs. Gene Gun-Technik	93
5.3.2 Spine-Quantifizierung: Manuelle 3D- vs. automatisierte 2D-Analyse	97
5.3.3 Korrelation zwischen manueller 3D- und automatisierter 2D-Spine-Analyse	99
5.4 Quantifizierung und Klassifizierung synaptischer Dornfortsätze in 14 Monate alten APPSWE-Mäusen	100
5.5 Funktionell-morphologische Charakterisierung von Synapsen im Vorderhirn präklinischer Maus- und Ratten-Modelle der Schizophrenie	102
5.5.1 Psychostimulans-basierte Modelle der Schizophrenie	102
5.5.1.1 Pharmakologische Induktion Schizophrenie-typischer Symptome mittels Amphetamin-Applikation	102
5.5.1.1.1 Lokomotorische Verhaltenssensitivierung nach subchronischer Amphetamin-Behandlung	102
5.5.1.1.2 Quantifizierung kortikaler und hippocampaler PV ⁺ Interneurone im Amphetamin-Modell	107
5.5.1.1.3 Untersuchung synaptischer Dornfortsätze im Amphetamin-Modell	108
5.5.1.1.4 Korrelation zwischen automatisierter 2D- und 3D-Spine-Analyse im Amphetamin-Modell	113
5.5.1.2 Pharmakologische Induktion Schizophrenie-typischer Symptome mittels Quinpirol-Applikation	116
5.5.1.2.1 Lokomotorische Verhaltenssensitivierung nach subchronischer Quinpirol-Behandlung ..	116
5.5.1.2.2 Quantifizierung kortikaler und hippocampaler PV ⁺ Interneurone im Quinpirol-Modell	119
5.5.1.2.3 Untersuchung synaptischer Dornfortsätze im Quinpirol-Modell	120
5.5.2 Neuroentwicklungsbiologische Modelle der Schizophrenie	125
5.5.2.1 Neurotoxische Induktion Schizophrenie-typischer Symptome mittels Methylazoxymethanolacetat-Exposition <i>in utero</i>	126
5.5.2.1.1 Quantifizierung kortikaler und hippocampaler PV ⁺ Interneurone im MAM-Modell	126
5.5.2.1.2 Untersuchung der dendritischen Komplexität hippocampaler Pyramidenneurone im MAM-Modell	127

5.5.2.2 Immunologische Induktion Schizophrenie-typischer Symptome mittels pränataler Poly I:C-Exposition	136
5.5.2.2.1 Untersuchung der dendritischen Komplexität kortikaler sowie hippocampaler Pyramidenneurone nach pränataler Poly I:C- und postnataler Risperidon-Behandlung	136
5.5.2.2.2 Untersuchung synaptischer Dornfortsätze nach pränataler Poly I:C- und postnataler Risperidon-Behandlung.....	141
5.5.3 Genetische Induktion Schizophrenie-typischer Symptome mittels Expression des mutierten humanen <i>DISC1</i> -Gens (disrupted-in-schizophrenia-1)	152
5.5.3.1 Quantifizierung kortikaler PV ⁺ Interneurone in mh <i>DISC1</i> -Mäusen.....	152
5.5.3.2 Untersuchung synaptischer Dornfortsätze des Gyrus dentatus in mh <i>DISC1</i> -Mäusen.....	153
6. Diskussion	155
6.1 Etablierung einer optimierten Methode zur Analyse synaptischer Dornfortsätze.....	155
6.1.1 Beurteilung der automatisierten 3D-Spine-Analyse.....	158
6.1.2 Ausblick auf die Optimierung der 3D-Spine-Analyse	160
6.2 Untersuchung synaptischer Dornfortsätze im APPSWE-Modell des Morbus Alzheimer.....	162
6.3 Funktionell-morphologische Charakterisierung von Synapsen im Vorderhirn präklinischer Maus- und Ratten-Modelle der Schizophrenie.....	164
6.3.1 Psychostimulans-basierte Modelle der Schizophrenie.....	164
6.3.1.1 Pharmakologische Induktion Schizophrenie-typischer Symptome mittels Amphetamin-Applikation	164
6.3.1.1.1 Lokomotorische Verhaltenssensitivierung nach subchronischer Amphetamin-Behandlung	164
6.3.1.1.2 Untersuchung synaptischer Dornfortsätze im Amphetamin-Modell	166
6.3.1.1.3 Quantifizierung kortikaler und hippocampaler PV ⁺ Interneurone im Amphetamin-Modell.....	167
6.3.1.1.4 Methodische Beurteilung des Amphetamin-Modells.....	168
6.3.1.2 Pharmakologische Induktion Schizophrenie-typischer Symptome mittels Quinpirol-Applikation	169
6.3.1.2.1 Lokomotorische Verhaltenssensitivierung nach subchronischer Quinpirol-Behandlung ..	169
6.3.1.2.2 Untersuchung synaptischer Dornfortsätze im Quinpirol-Modell	169
6.3.1.2.3 Untersuchung synaptischer Dornfortsätze - vergleichende Betrachtung der zwei pharmakologisch-induzierten Rattenmodelle der Schizophrenie.....	171
6.3.1.2.4 Quantifizierung kortikaler und hippocampaler PV ⁺ Interneurone im Quinpirol-Modell.....	172
6.3.2 Neuroentwicklungsbiologische Modelle der Schizophrenie	173
6.3.2.1 Neurotoxische Induktion Schizophrenie-typischer Symptome mittels Methylazoxymethanolacetat-Exposition <i>in utero</i>	173
6.3.2.1.1 Ektopische Zellcluster im Hippokampus nach MAM-Exposition <i>in utero</i>	173

6.3.2.1.2 Untersuchung der dendritischen Komplexität hippocampaler Pyramidenneurone im MAM-Modell	174
6.3.2.1.3 Quantifizierung kortikaler und hippocampaler PV ⁺ Interneurone im MAM-Modell.....	176
6.3.2.2 Immunologische Induktion Schizophrenie-typischer Symptome mittels pränataler Poly I:C-Behandlung.....	177
6.3.2.2.1 Untersuchung der dendritischen Komplexität präfrontaler Pyramidenneurone im Poly I:C-Modell	177
6.3.2.2.2 Untersuchung der dendritischen Komplexität - vergleichende Betrachtung der zwei neuroentwicklungsbiologischen Rattenmodelle der Schizophrenie.....	179
6.3.2.2.3 Untersuchung synaptischer Dornfortsätze im Poly I:C-Modell	180
6.3.2.2.4 Untersuchung synaptischer Dornfortsätze - vergleichende Betrachtung zwischen Poly I:C- und Quinpirol-Modell	183
6.3.3 Genetische Induktion Schizophrenie-typischer Symptome mittels Expression des mutierten humanen <i>DISC1</i> -Gens (disrupted-in-schizophrenia-1)	184
6.3.3.1 Untersuchung synaptischer Dornfortsätze im mh <i>DISC1</i> -Modell	184
6.3.3.2 Quantifizierung kortikaler PV ⁺ Interneurone im mh <i>DISC1</i> -Modell.....	185
6.3.4 Abschließende Gesamtbeurteilung der verwendeten präklinischen Schizophrenie-Modelle.....	186
7. Zusammenfassung	189
8. Summary	193
9. Referenzen.....	197
Lebenslauf	212
Publikations- und Posterübersicht	213
Danksagungen	214

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
Aβ	Amyloid-Beta-Peptid
Abb.	Abbildung
AD	Alzheimer's disease (Morbus Alzheimer)
	Außendurchmesser
AK	Antikörper
AMG	Amygdala
AMPA	α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-Isoxazolpropionat
AMPH	d-Amphetaminsulfat
ANOVA	Analysis of Variance (Varianzanalyse)
APP _{SWE}	amyloid precursor protein, Swedish mutation (Amyloid-Vorläuferprotein mit Schwedischer Mutation)
AU	Airy Unit
Aufl.	Auflage
B	Belgien
BNST	Bed Nukleus, Stria terminalis
bzw.	beziehungsweise
CA	Cornu ammonis (Ammonshorn)
ca.	zirka
Cg1	cingulärer Kortex, Areal 1
cm	Zentimeter
CPu	caudate putamen (Nukleus caudatus + Putamen = Striatum)
CT	Computertomographie
D	Deutschland
DA	Dopamin
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAT	Dopamin-Transporter
DG	dentate gyrus (Gyrus dentatus)
d. h.	das heißt
Dil	1,1'-Diocetadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyaninperchlorat
DiO	3,3'-Diocetadecyloxacarbocyaninperchlorat
DK	Dänemark
DLFC	dorsolateral-präfrontaler Kortex
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DOPAC	3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure
DSM-5	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edition (Diagnostisches und Statistisches Handbuch Psychischer Störungen, 5. Aufl., 2013)

dsRNA	double-stranded RNA (dopplesträngige RNS)
engl.	englisch
et al.	et alii/et alteri (und andere)
F	Frankreich
ff.	und folgende
GABA	gamma-aminobutyric acid (γ-Aminobuttersäure)
GD	gestation day (Trächtigkeitstag)
Gr.	Gruppe
Hc	Hippokampus
Hz	Hertz
ICD-10	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10th Revision (Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Revision, 1992)
ID	Innendurchmesser
IL	infralimbischer Kortex
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
LDTg	latero-dorsaler tegmentaler Nukleus
LH	lateral Hypothalamus
LSD	Lysergsäurediethylamid
LSM	Laser Scanning Mikroskop
M	molar
M1	primärer Motorkortex
MAM	Methylazoxymethanolacetat
MAP2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2
MAX	Maximum
µm	Mikrometer
mg	Milligramm
mhDISC1	mutiertes humanes DISC1-Gen (disrupted-in-schizophrenia-1)
MIN	Minimum
ml	Milliliter
mPFC	medial-präfrontaler Kortex
mRNA	messenger RNA (Boten-RNS)
MRT	Magnetresonanztomographie, Kernspintomographie
MSN/MSNs	medium spiny neuron/neurons (mittelgroßes, bedorntes Neuron/Neurone)
n	Stichprobengröße
NAc / NAcc	Nukleus accumbens
NaCl	Natriumchlorid (0,9%ige Kochsalzlösung)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NL	Niederlande
n. s.	nicht signifikant
o.	oben
OF	Open Field (Offenfeld)

o. g.	oben genannt
p	Signifikanzniveau, Fehlerwahrscheinlichkeit
PBS	phosphatgepufferte 0,9%ige Kochsalzlösung
PFC	präfrontaler Kortex
PND	postnatal day (postnataler Tag)
Poly I:C	Polyinosin-Polycytidylsäure
PrL	prälimbischer Kortex
PV/PV ⁺	Parvalbumin/Parvalbumin-positiv
Quinp.	Quinpirol(hydrochlorid)
RIS	Risperidon
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure, RNS)
s	Sekunde
s.	siehe
s.c.	subkutan
SEM	standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwerts)
SER	smooth endoplasmic reticulum (glattes endoplasmatisches Retikulum)
STR	Striatum
Tab.	Tabelle
Tg	transgen
u.	unten
u. a.	und andere; unter anderem
UK	United Kingdom (England)
USA	United States of America (Vereinigte Staaten von Amerika)
u. U.	unter Umständen
u. z.s. t-Test	ungepaarter, zweiseitiger t-Test
vgl.	vergleiche
VP	ventrales Pallidum
vs.	versus
VTA	ventral tegmental area (Area tegmentalis ventralis = ventrales Tegmentum)
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
z. T.	zum Teil

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung des multifaktoriellen Ätiologie-Konzepts der Schizophrenie.....	6
Abb. 2: Klinischer Langzeitverlauf der Schizophrenie.....	9
Abb. 3: Schematische Darstellung des mesolimbischen und mesokortikalen DA-Systems.....	16
Abb. 4: Schematische Darstellung des Tet-off-Systems zur Herstellung bitransgener CaMKII-tTA x tet-hDISC1-Mäuse.....	31
Abb. 5: Skizzen der Morphologie der vier analysierten Spine-Klassen.....	39
Abb. 6: Experimentelles Design der Amphetamin-Studie.....	55
Abb. 7: Experimentelles Design der Quinpirol-Studie.....	57
Abb. 8: Experimentelles Design der Poly I:C-Studie.....	58
Abb. 9: Skizze des Versuchsaufbaus des Open Field-Tests.....	61
Abb. 10: Anti-Parvalbumin markierte Koronarschnitte zur Verdeutlichung der untersuchten Gehirnregionen ..	66
Abb. 11: Darstellung einer mikrocarrierhaltigen Gene Gun-Patrone.....	68
Abb. 12a: Darstellung der für die diolistische Fluoreszenzmarkierung eingesetzten handgeführten Gene Gun	70
Abb. 12b: Schematischer Längsschnitt der Gene Gun.....	70
Abb. 12c: Die Gene Gun im Einsatz während des „Schießens“.....	70
Abb. 13: Skizze eines Pyramidenneurons mit den verschiedenen Dendritbereichen	73
Abb. 14: Schematische Darstellung der für die Spine- und Sholl-Analyse evaluierten Gehirnareale	74
Abb. 15: Schematische Darstellung einer Pyramidenzelle mit den sie umgebenden konzentrischen Kreisen der Sholl-Analyse	76
Abb. 16: Exemplarische Demonstration einer Sholl-analysierten kortikalen Pyramidenzelle (mPFC).....	77
Abb. 17: Vergleich der Bildqualität konfokaler LSM-Fotos	82
Abb. 18: Die Klassifikationsparameter der vier untersuchten Spine-Subtypen	84
Abb. 19: Automatisierte 2D-Spine-Quantifizierung unter Nutzung von Definiens Architect XD.....	87
Abb. 20: Automatisierte 3D-Spine-Analyse mit dem für Definiens Architect XD entwickelten Spine-Analyse-Modul.....	90
Abb. 21a: Automatisierte 3D-Spine-Klassifikation via Definiens Architect XD.....	91
Abb. 21b: Beispielhafte Exemplare synaptischer Dornfortsätze undefinierter Morphologie („undefined spines“)	91
Abb. 22: Schematische Darstellung der dorsalen hippocampalen CA1-Region sowie eines dort lokalisierten Pyramidenneurons.....	93
Abb. 23: Gesamt-Spinedichte basaler distaler Dendritensegmente in CA1 acht Monate alter APPSWE-Mäuse: Golgi-Cox-Färbung vs. Gene Gun-Technik	94
Abb. 24: Gesamtzahlen an Mushroom- sowie Filopodia-Spines basaler distaler Dendritensegmente in CA1 acht Monate alter APPSWE-Mäuse: Golgi-Cox-Färbung vs. Gene Gun-Technik.....	96
Abb. 25: Gesamt-Spinedichte basaler distaler Dendritensegmente in CA1 acht Monate alter APPSWE-Mäuse: Manuelle 3D- vs. automatisierte 2D-Analyse	97
Abb. 26a: Resultate der automatisierten 3D-Spine-Analyse basaler distaler Dendritensegmente in CA1 14 Monate alter APPSWE-Mäuse.....	100
Abb. 26b: Beispielhafte Exemplare Dil-markierter, basal-distaler Dendritensegmente in CA1 14 Monate alter APPSWE-Mäuse.....	101
Abb. 27: Jeweils zurückgelegte Gesamtlaufstrecke während des Open Field-Tests nach akuter sowie subchronischer AMPH-Behandlung.....	103

Abb. 28: Exemplarische Darstellung der Laufstrecke im Open Field-Test nach akuter sowie subchronischer AMPH-Behandlung	106
Abb. 29: Quantifizierung der PV ⁺ Interneurone in kortikalen und subkortikalen Hirnregionen nach akuter bzw. subchronischer AMPH-Behandlung.....	107
Abb. 30: Quantitäten der Spine-Subtypen auf distalen Dendritensegmenten verschiedener Hirnregionen nach akuter sowie subchronischer AMPH-Behandlung.....	109
Abb. 31: Beispielhafte Exemplare Dil-markierter, distaler Dendritensegmente akut sowie subchronisch mit AMPH behandelte Sprague Dawley-Ratten.....	112
Abb. 32: Jeweils zurückgelegte Gesamtlaufstrecke während des Open Field-Tests nach akuter sowie subchronischer Quinpirol-Behandlung.....	116
Abb. 33: Exemplarische Darstellung der Laufstrecke im Open Field-Test nach akuter sowie subchronischer Quinpirol-Behandlung.....	118
Abb. 34: Quantifizierung der PV ⁺ Interneurone in kortikalen und subkortikalen Hirnregionen nach akuter sowie subchronischer Quinpirol-Behandlung.....	119
Abb. 35: Quantitäten der Spine-Subtypen auf distalen Dendritensegmenten verschiedener Hirnregionen nach akuter sowie subchronischer Quinpirol-Behandlung.....	122
Abb. 36: Beispielhafte Exemplare Dil-markierter, distaler Dendritensegmente akut sowie subchronisch mit Quinpirol behandelte Sprague Dawley-Ratten.....	125
Abb. 37: Quantifizierung der PV ⁺ Interneurone in kortikalen und subkortikalen Hirnregionen nach NaCl- vs. MAM-Exposition <i>in utero</i>	126
Abb. 38a: Graphische Darstellung der mittels Sholl-Analyse erfassten dendritischen Komplexität der Pyramidenneurone in CA1 nach NaCl- vs. MAM-Exposition <i>in utero</i>	128
Abb. 38b: Beispielhafte Exemplare Dil-markierter Pyramidenneurone in CA1 nach NaCl- vs. MAM-Exposition <i>in utero</i>	129
Abb. 39a: Graphische Darstellung der mittels Sholl-Analyse erfassten dendritischen Komplexität der Pyramidenneurone in CA2 nach NaCl- vs. MAM-Exposition <i>in utero</i>	130
Abb. 39b: Beispielhafte Exemplare Dil-markierter Pyramidenneurone in CA2 nach NaCl- vs. MAM-Exposition <i>in utero</i>	131
Abb. 40a: Graphische Darstellung der mittels Sholl-Analyse erfassten dendritischen Komplexität der Pyramidenneurone in CA3 nach NaCl- vs. MAM-Exposition <i>in utero</i>	132
Abb. 40b: Beispielhafte Exemplare Dil-markierter Pyramidenneurone in CA3 nach NaCl- vs. MAM-Exposition <i>in utero</i>	133
Abb. 41: Anzahl der Schnittpunkte zwischen den Dendriten der Pyramidenneurone in CA1-3 und den konzentrischen Sholl-Kreisen nach NaCl- vs. MAM-Exposition <i>in utero</i>	135
Abb. 42a: Graphische Darstellung der mittels Sholl-Analyse erfassten dendritischen Komplexität der Pyramidenneurone des mPFC nach pränataler Poly I:C- und postnataler Risperidon-Behandlung.....	137
Abb. 42b: Beispielhafte Exemplare Dil-markierter Pyramidenneurone im mPFC nach pränataler Poly I:C- und postnataler Risperidon-Behandlung.....	139
Abb. 43: Anzahl der Schnittpunkte zwischen den Dendriten der Pyramidenneurone im mPFC und den konzentrischen Sholl-Kreisen nach pränataler Poly I:C- und postnataler Risperidon-Behandlung.....	140
Abb. 44a: Quantitäten der Spine-Subtypen auf distalen Dendritensegmenten im medial-präfrontalen Kortex (mPFC) nach pränataler Poly I:C- und postnataler Risperidon-Behandlung.....	142
Abb. 44b: Beispielhafte Exemplare Dil-markierter, distaler Dendritensegmente des mPFC pränatal mit Poly I:C und postnatal mit Risperidon behandelte Wistar-Ratten	144

Abb. 45a: Quantitäten der Spine-Subtypen auf distalen Dendritensegmenten im cingulären Kortex, Areal 1 (Cg1) nach pränataler Poly I:C- und postnataler Risperidon-Behandlung.....	145
Abb. 45b: Beispielhafte Exemplare Dil-markierter, distaler Dendritensegmente in Cg1 pränatal mit Poly I:C und postnatal mit Risperidon behandelter Wistar-Ratten.....	146
Abb. 46: Quantitäten der Spine-Subtypen auf distalen Dendritensegmenten im dorsalen Striatum (STR) nach pränataler Poly I:C- und postnataler Risperidon-Behandlung.....	147
Abb. 47a: Quantitäten der Spine-Subtypen auf distalen Dendritensegmenten in der Schalenregion des Nukleus accumbens nach pränataler Poly I:C- und postnataler Risperidon-Behandlung.....	148
Abb. 47b: Beispielhafte Exemplare Dil-markierter, distaler Dendritensegmente im NAcc (Schalenregion) pränatal mit Poly I:C und postnatal mit Risperidon behandelter Wistar-Ratten.....	149
Abb. 48: Quantitäten der Spine-Subtypen auf apikalen, distalen Dendritensegmenten in der hippocampalen CA1-Region nach pränataler Poly I:C- und postnataler Risperidon-Behandlung.....	150
Abb. 49: Quantifizierung der PV ⁺ Interneurone kortikaler Hirnregionen in mhDISC1-Mäusen	153
Abb. 50: Automatisch erfasste 2D-Spine-Zahlen distaler Dendritensegmente der Körnerzellen im Gyrus dentatus von mhDISC1-Mäusen	154
Abb. 51: Exemplarische Darstellung der Anwendung des „Skelett-Modells“ in der automatisierten 3D-Spine-Analyse.....	161

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Vor- und Nachteile der Gene Gun-Technik.....	47
Tab. 2: Die für die AMPH-Studie eingesetzten Versuchstiergruppen	55
Tab. 3: Die für die Quinpirol-Studie eingesetzten Versuchstiergruppen	57
Tab. 4: Die für die Poly I:C-Studie eingesetzten Versuchstiergruppen	59
Tab. 5: Gegenüberstellung der Resultate der drei Spine-Analyse-Verfahren	98
Tab. 6: Resultate der Korrelationsanalyse der 2D- und 3D-Spinedichten in Wildtyp- und transgenen APPSWE-Mäusen.....	99
Tab. 7: Übersicht der jeweils zurückgelegten mittleren Gesamtlaufstrecke im Open Field-Test nach akuter bzw. subchronischer Amphetamin-Applikation.....	105
Tab. 8: Zusammenfassung der Mittelwerte \pm SEM, Stichprobengrößen sowie p-Werte der 3D-Spine-Analyse nach akuter bzw. subchronischer AMPH-Behandlung.....	111
Tab. 9: Resultate der Korrelationsanalyse der 2D- und 3D-Spinedichten nach akuter Amphetamin-Behandlung	115
Tab. 10: Resultate der Korrelationsanalyse der 2D- und 3D-Spinedichten nach subchronischer Amphetamin-Behandlung	115
Tab. 11: Übersicht der jeweils zurückgelegten mittleren Gesamtlaufstrecke im Open Field-Test nach akuter bzw. subchronischer Quinpirol-Applikation.....	118
Tab. 12: Zusammenfassung der Mittelwerte \pm SEM, Stichprobengrößen sowie p-Werte der 3D-Spine-Analyse nach akuter bzw. subchronischer Quinpirol-Applikation	124
Tab. 13: Übersicht der mittels Sholl-Analyse gewonnenen Daten für die Pyramidenneurone des medial-präfrontalen Kortex	138
Tab. 14: Übersicht der mittels Sholl-Analyse gewonnenen Daten für die Pyramidenneurone der hippocampalen CA1-Region	141

1. Einführung

Etwa 90 % aller exzitatorischen Synapsen des ausgereiften Säuger-Gehirns sind auf den Köpfen synaptischer Dornfortsätze (engl. spines) lokalisiert, sodass der erregende Input primär über diese kleinen postsynaptischen Membranvorwölbungen neuronaler Dendriten vermittelt wird (HARRIS & KATER, 1994; TACKENBERG et al., 2009). Abweichungen in Dichte und Struktur der Spines wurden für zahlreiche neurodegenerative und -psychiatrische Erkrankungen wie z. B. für Schizophrenie v. a. anhand von *post mortem*-Untersuchungen gezeigt. Schizophrenie ist eine schwerwiegende psychiatrische Erkrankung, deren Lebenszeitprävalenz weltweit 0,5 bis 1,6 % beträgt, wobei das bevorzugte Erkrankungsalter zwischen dem 15. und 35. Lebensjahr liegt (GAEBEL & FALKAI, 1998; WOBROCK et al., 2004). Die äußerst heterogene Schizophrenie-Symptomatik ist nur ansatzweise und in der Regel nicht ohne (starke) Nebenwirkungen behandelbar. Zudem sind besonders die ersten Krankheitsjahre von einer zunehmenden Verschlechterung der Symptomatik gekennzeichnet bis oftmals ein Plateau erreicht wird, das in einer Remission oder einer chronischen Erkrankung resultiert (TANDON et al., 2009). Da auch heute die Pathogenese der Schizophrenie bei Weitem noch nicht vollständig aufgeklärt ist, steht der Gewinn neuer Erkenntnisse im Fokus des Interesses, um darauf aufbauend bestenfalls neue optimierte therapeutische Interventionen zu entwickeln. Für präklinische Tiermodelle der Schizophrenie belegen bisher nur wenige Studien primär quantitative Spine-Veränderungen, weshalb das Hauptarbeitsziel der vorliegenden Dissertation darin bestand, different induzierte Nagermodelle der Schizophrenie neuroanatomisch näher zu charakterisieren. Damit sollten in Hinblick auf Therapieansätze weiterführende pathologische Mechanismen der humanen Erkrankung präklinisch dargestellt sowie neue morphologische Details gewonnen werden. Zu diesem Zweck galt es im ersten Arbeitsabschnitt eine Methodenvvalidierung und -etablierung vorzunehmen. Mit dem etablierten Verfahren sollten Spines (wie auch gesamte Zellen) unter Zuhilfenahme einer handgeführten Gene Gun fluoreszenzmarkiert und nachfolgend automatisiert zuerst in 2D (zweidimensional) quantifiziert, später in 3D (dreidimensional) ebenfalls quantifiziert, aber auch auf Basis vordefinierter Parameter in Subtypen klassifiziert werden. Die Verifizierung von Markierungsmethode und automatisierter 2D-Quantifizierung erfolgte mit Hilfe eines transgenen Mausmodells des Morbus Alzheimer, für das bereits vor der Anfertigung dieser Dissertation Erfahrungswerte für die Spine-Analyse der hippocampalen CA1-Region (Cornu Ammonis) auf Basis Golgi-gefärbter Koronarschnitte existierten (PEREZ-CRUZ et al., 2011) und diese hier als Referenz für die neu gewonnenen Erkenntnisse zugrunde gelegt

werden konnten. Zwar konnten auch in Alzheimer-Patienten *post mortem* synaptische Defizite detektiert und mit den krankheitstypischen Störungen in Gedächtnis und Kognition korreliert werden, jedoch standen in der vorliegenden Arbeit nicht die pathologischen Spine-Alterationen bei Morbus Alzheimer im Vordergrund, sondern vielmehr die Etablierung des Markierungs- und automatisierten Spine-Analyseverfahrens. Wie oben bereits erwähnt sollte diese Technik dann im Hauptteil der Arbeit eingesetzt werden, um neue morphologische Details in verschiedenartig generierten Tiermodellen der Schizophrenie offenzulegen. Neben der automatisierten Spine-Quantifizierung und -Klassifizierung schloss die Untersuchung eine Komplexitätsbestimmung neuronaler Dendriten und/oder eine immunhistochemische Interneuron-Quantifizierung ein. Sowohl die präklinische Reproduktion pathologischer Vorgänge der humanen Erkrankung als auch die vertiefende neuroanatomische Charakterisierung entsprechender Tiermodelle sind essentiell für die Weiterentwicklung der Antipsychotika mit dem Ziel, die z. T. erheblichen Nebenwirkungen bei optimalem Wirksamkeitseffekt zu minimieren, bestenfalls zu eliminieren.

2. Einleitung

2.1 Schizophrenie

2.1.1 Definition und Terminologie

Die Schizophrenie (altgriechisch: schizein = abspalten, phren = Verstand, Geist, Seele) ist eine schwerwiegende psychiatrische Erkrankung, welche sich aus einer temporären akuten und einer persistierenden chronischen Phase zusammensetzt (GAEBEL & FALKAI, 1998). Zwar beziehen sich die psychischen Störungen im Wesentlichen auf die Bereiche des Denkens, der Wahrnehmung, der Affektivität und der Sprache, dennoch wird die Schizophrenie durch vielfältige mentale Veränderungen sowie diverse Verhaltensphänomene und demnach durch eine sehr heterogene Symptomatik und durch polymorphe Verlaufsmuster charakterisiert. Aufgrund dessen handelt es sich bei der Schizophrenie eher um eine vielschichtige Störungsgruppe multifaktorieller Pathogenese als um eine Krankheitseinheit (GAEBEL & FALKAI, 1998; TANDON et al., 2009).

Unsere heutige Bezeichnung „Schizophrenie“ ist auf den Schweizer Psychiater Eugen Bleuler (1857-1939) zurückzuführen (DEISTER & MÖLLER, 1998; SARTORY, 2007), der den Terminus 1908 erstmals öffentlich nutzte und durch die Publikation seines Schizophreniekonzepts im Jahr 1911 („Dementia praecox oder die Gruppe der Schizophrenien“) einführte. Damit wurde der bis dahin gebräuchliche, auf den deutschen Psychiater Emil Kraepelin (1856-1926) zurückgehende Begriff „Dementia praecox“ (1893) abgelöst. Anfang der 1980er Jahre wurden die Bezeichnungen „positive und negative Symptome“ von der amerikanischen Neurowissenschaftlerin und Psychiaterin Nancy Andreasen etabliert und 1987 von Peter Liddle, einem australischen Mediziner und Psychiater, durch einen dritten Faktor, die „Desorganisation“ (Denkstörungen, unlogisches Denken) (SARTORY, 2007) ergänzt, wodurch kognitive Einbußen als weiteres Kernmerkmal der Schizophrenie mit in den Vordergrund traten. Unter Berücksichtigung früherer Schizophrenie-Konzepte wurden die wiederholt überarbeiteten, heute international gültigen Diagnose-Systeme ICD-10 (engl. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10th Revision; Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Revision, 1992) und DSM-5 (engl. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edition; Diagnostisches und Statistisches Handbuch Psychischer Störungen, 5. Aufl., 2013) von der Weltgesundheitsorganisation bzw. der amerikanischen Psychiatrie-Vereinigung ausgearbeitet (OLBRICH et al., 2004; TANDON et al., 2009).

2.1.3 Epidemiologie

Das Risiko einer Person, im Laufe des Lebens mindestens einmal an einer schizophrenen Psychose zu erkranken (Lebenszeitprävalenz) beträgt weltweit 0,5 bis 1,6 % (GAEBEL & FALKAI, 1998; WOBROCK et al., 2004). Zwar ist das Lebenszeitrisiko einer Erkrankung für beide Geschlechter gleich, jedoch sind Männer etwa 3 - 4 Jahre früher betroffen (DEISTER & MÖLLER, 1998; OLBRICH et al., 2004; WOBROCK et al., 2004). Gemäß HÄFNER et al. (1991) liegt das höchste Erkrankungsrisiko bei Männern demnach in einem Bereich zwischen 20 und 24 Jahren, bei Frauen zwischen 25 und 29 Jahren. Weiterhin lässt sich bei Frauen im Alter zwischen 45 und 54 Jahren, d. h. etwa zum Zeitpunkt der Menopause, ein zweiter, niedrigerer Anstieg des Erkrankungsrisikos verzeichnen (DEISTER & MÖLLER, 1998; JONES & BUCKLEY, 2006). Als bislang hypothetische Begründung werden hierfür psychosoziale Faktoren sowie eine protektive Einflussnahme der Östrogene angeführt (WOBROCK et al., 2004). Innerhalb eines Jahres erkranken weltweit etwa 15,2 Patienten pro 100.000 Einwohner neu an Schizophrenie (MCGRATH et al., 2004); das bevorzugte Erkrankungsalter liegt dabei zwischen dem 15. und 35. Lebensjahr, in zwei Drittel der Fälle allerdings schon vor dem 30. Lebensjahr (GAEBEL & FALKAI, 1998). Vor der Pubertät sowie nach dem 40. Lebensjahr ist ein Beginn der Schizophrenie möglich, aber selten (LEWIS & LIEBERMAN, 2000).

2.1.4 Ätiopathogenese

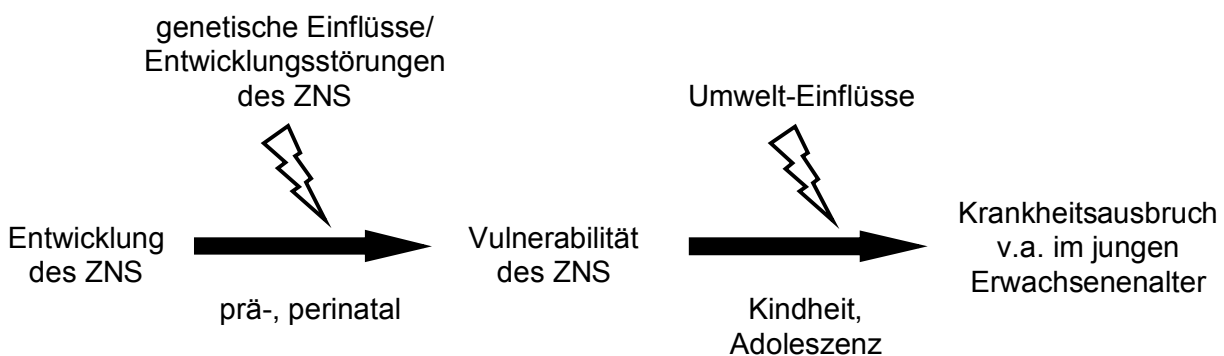
Zwar sind die Ätiologie und Pathogenese einer Schizophrenie bisher nur ansatzweise verstanden (RAPOPORT et al., 2005; DAWE et al., 2009), jedoch geht aus der Literatur hervor, dass es sich um eine multifaktorielle Ätiopathogenese handelt, in der sowohl genetische (polygener Erbgang) als auch Umweltfaktoren eine Rolle spielen bzw. miteinander interagieren (LEWIS & LIEBERMAN, 2000; SULLIVAN, 2005; ARCHER, 2010). So ging aus Familien-, Zwillings- und Adoptionsstudien hervor, dass die Vulnerabilität, d. h. die Anfälligkeit bzw. das Risiko, an einer Schizophrenie zu erkranken, steigt, je näher der Verwandtschaftsgrad zu einer bereits an Schizophrenie erkrankten Person ist (LEWIS & LIEBERMAN, 2000; TANDON et al., 2008b). Für Verwandte ersten Grades (Eltern, Geschwister, Kinder) beträgt das durchschnittliche Risiko, an Schizophrenie zu erkranken, 6-17 %, wobei sich das Erkrankungsrisiko der Kinder auf nahezu 50 % erhöht, wenn beide Elternteile an Schizophrenie leiden (SARTORY, 2007). Entsprechendes gilt auch für eineiige Zwillinge (LEWIS & LIEBERMAN, 2000).

Auf der Basis molekular-genetischer Untersuchungen konnten auf verschiedenen Chromosomen (u. a. 1, 6, 8, 22) potentielle Vulnerabilitätsgene für die Entwicklung einer Schizophrenie identifiziert werden wie z. B. *DISC1* (disrupted-in-schizophrenia-1; s. auch Abschnitt 2.2.3), *DTNBP1* (Dysbindin-1), *NRG1* (Neuregulin-1) und *COMT* (Catechol-O-Methyltransferase) (LEWIS & LIEBERMAN, 2000; TANDON et al., 2008b). Während die Proteinprodukte der drei ersten Kandidatengene in Neurogenese, neuronale Migration, Dendritenreifung sowie Synaptogenese involviert sind (AYHAN et al., 2011), ist das Enzym Catechol-O-Methyltransferase essentiell für den Abbau bzw. die Inaktivierung der Catecholamine, z. B. Dopamin.

Wie auch in Abb. 1 schematisch illustriert (s. u.), geht man davon aus, dass nicht nur ein Faktor, wie z. B. die genetische Komponente, die Entstehung einer schizophrenen Erkrankung bedingt, sondern vielmehr die Interaktion diverser Risikofaktoren, zu denen nicht nur biologische, sondern auch psychosoziale Aspekte zählen, welche sich prä-, peri- oder postnatal - während der Kindheit, Adoleszenz oder im frühen Erwachsenenalter - ereignen können (RAPOPORT et al., 2005; SULLIVAN, 2005; TANDON et al., 2008b). Besonders während des ersten und frühen zweiten Schwangerschaftstrimesters (TANDON et al., 2008b) können pränatale Einflüsse eine Prädisposition für die spätere Entwicklung einer Schizophrenie bewirken. Dazu zählen maternale Infektionen mit u. a. Influenza, Rubella oder *Toxoplasma gondii*, eine intrauterine Mangelernährung, für die Mutter belastende Lebensereignisse (z. B. Todesfall) oder auch das Ungewolltsein des Kindes (SULLIVAN, 2005; TANDON et al., 2008b). Des Weiteren können Geburtskomplikationen, z. B. eine fetale Hypoxie, wie auch ein fortgeschrittenes Alter des Vaters zum Zeitpunkt der Empfängnis das Risiko einer späteren schizophrenen Erkrankung des Kindes deutlich erhöhen (TANDON et al., 2008b). Ferner wurde festgestellt, dass Menschen, die in den Wintermonaten (OLBRICH et al., 2004; SULLIVAN, 2005) oder in einer Stadt geboren und/oder aufgewachsen sind (LEWIS & GONZÁLEZ-BURGOS, 2008; FATEMI & FOLSOM, 2009), häufiger an Schizophrenie erkranken als in den Sommermonaten geborene und auf dem Land lebende Individuen. Aus der Interaktion zwischen einer genetisch bedingten Diathese und den zuvor genannten prä- und perinatalen Einflüssen resultieren eine fehlerhafte Konnektivität zahlreicher Gehirnareale (LEWIS & LIEBERMAN, 2000) bzw. biochemische und morphologische Veränderungen des sich entwickelnden Zentralnervensystems, welche im Abschnitt 2.1.8 erläutert werden, und bedingen damit eine Vulnerabilität bzw. Prädisposition des Kindes für eine schizophrene Manifestation im jungen Erwachsenenalter (MAYNARD et al., 2001; vgl. Abb. 1). Treten postnatal, v. a.

während der Kindheit und Adoleszenz, weitere Stressoren auf, können diese den Ausbruch der Erkrankung aufgrund der gestörten neuronalen Verschaltungen, d. h. aufgrund der bestehenden Anfälligkeit und reduzierten Bewältigungsfähigkeit induzieren (MAYNARD et al., 2001; OLBRICH et al., 2004; s. Abb. 1). Hinsichtlich dieser Stressoren sind neben psychosozialen Faktoren, wie belastenden Lebensereignissen (z. B. Verlust eines Familienmitglieds) und der Familienatmosphäre auch traumatische Erlebnisse (z. B. sexueller Missbrauch, körperliche Misshandlung) sowie toxische Einwirkungen bedingt durch Alkohol- oder Drogenkonsum (v. a. Cannabis, Amphetamine, Kokain) von besonderer Bedeutung (OLBRICH et al., 2004; ROSENBERG et al., 2007).

Abb. 1: Schematische Darstellung des multifaktoriellen Ätiologie-Konzepts der Schizophrenie



(in Anlehnung an MAYNARD et al., 2001)

Das voranstehende Schema verdeutlicht, dass in die Ätiologie einer Schizophrenie multiple Faktoren involviert sind. Zuerst wird eine Vulnerabilität des Zentralnervensystems (ZNS) durch eine genetische Veranlagung und/oder sich prä- bzw. perinatal ereignende Störungen der ZNS-Entwicklung induziert. Treten im späteren Leben der betroffenen Person, v. a. während der Kindheit oder Jugend, weitere Stressoren in Form von Umwelt-Einflüssen auf, kann es aufgrund der Prädisposition des ZNS (fehlerhafte Konnektivität, biochemische/morphologische Alterationen) besonders im jungen Erwachsenenalter zur Erstmanifestation einer Schizophrenie kommen.

2.1.5 Symptomatik

In Hinblick auf die Gesamtheit der psychiatrischen Störungen ist die Symptomatik schizophrener wie auch anderer wahnhafter Psychosen die heterogenste (DEISTER & MÖLLER, 1998), die fast alle psychischen Funktionen betrifft (GAEBEL & FALKAI, 1998). Laut DEISTER & MÖLLER (1998) zeigen fast alle Schizophrenie-Patienten Beeinträchtigungen der Affektivität (97,8 %) und des formalen Denkens (90,1 %). Ebenfalls sehr häufig liegen Antriebs- sowie psychomotorische Störungen vor (je 84,6 %), gefolgt von

verschiedenartigen Wahnphänomenen (69,2 %), Halluzinationen (59,3 %) sowie Störungen des Ich-Erlebens (45,1 %). Wie bereits eingangs erwähnt, lässt sich die Schizophrenie in verschiedene Erkrankungsphasen differenzieren, von denen besonders die psychotische (akute) sowie die residuale (chronische) Phase von differenten Symptomen geprägt sind (vgl. Abb. 2). Im Zeitraum des psychotischen Schubs treten primär positive Symptome auf, in der residualen Phase dominieren die negativen Symptome, begleitet von Defiziten der Kognition und Sozialität (TANDON et al., 2009). Unter der Positiv- bzw. Plussymptomatik sind Phänomene zu verstehen, die beim Gesunden nicht vorkommen und damit ein „Plus“ des normalen Erlebens darstellen. Demgegenüber beschreibt die Negativ- oder Minussymptomatik ein „Minus“ des normalen Erlebens, d. h. die Einschränkung oder sogar das Fehlen psychischer Eigenschaften, die beim Gesunden vorliegen (DEISTER & MÖLLER, 1998). Während ursprünglich davon ausgegangen wurde, dass kognitive Defizite nur bei älteren Schizophrenie-Patienten vorkommen, bei denen die Erkrankung bereits weit fortgeschritten ist, hat sich diese Ansicht in den letzten 25 Jahren dahingehend gewandelt, als dass die Beeinträchtigungen der Kognition zum einen regelmäßig, zum anderen häufig schon vor der Erstmanifestation der Schizophrenie auftreten (O´CARROLL, 2000; LEWIS et al., 2012). Zur Verdeutlichung der Heterogenität sind die schizophrenen Symptome nachfolgend aufgelistet.

Positive Symptome/Plussymptomatik (ANDREASEN & OLSEN, 1982; OLBRICH et al., 2004):

Halluzinationen (Wahrnehmungsstörungen; am häufigsten akustische Halluzinationen in Form von Stimmenhören)

Wahn (inhaltliche Denkstörungen; z. B. Wahneinfälle wie Verfolgungs- oder Beziehungswahn)

Störungen des Ich-Erlebens (z. B. Gedankeneingebung, Willensbeeinflussung)

Störungen des formalen Denkens (z. B. Denkzerfahrenheit, Gedankenabreißen)

bizarres oder desorganisiertes Verhalten (z. B. soziales oder sexuelles Fehlverhalten, Stereotypen)

Negative Symptome/Minussymptomatik (ANDREASEN, 1982; ANDREASEN & OLSEN, 1982):

Affektverflachung oder -starrheit (z. B. inadäquate Affekte, Paramimie)

Alogie (z. B. Verarmung von Sprache und Gesprächsinhalt)

Antriebslosigkeit – Apathie (z. B. Inpersistenz in Schule/Beruf)

Anhedonie – Asozialität (z. B. Desinteresse an Freizeit- oder sexuellen Aktivitäten, sozialer Rückzug)

Aufmerksamkeitsdefizite

Kognitive Symptome (LEWIS & LIEBERMAN, 2000; O'CARROLL, 2000)

Aufmerksamkeits- und Gedächtnisstörungen, Defizite exekutiver Funktionen und der Psychomotorik, erniedrigte Intelligenz

Stimmungssymptome (LEWIS & LIEBERMAN, 2000; LIEBERMAN et al., 2001)

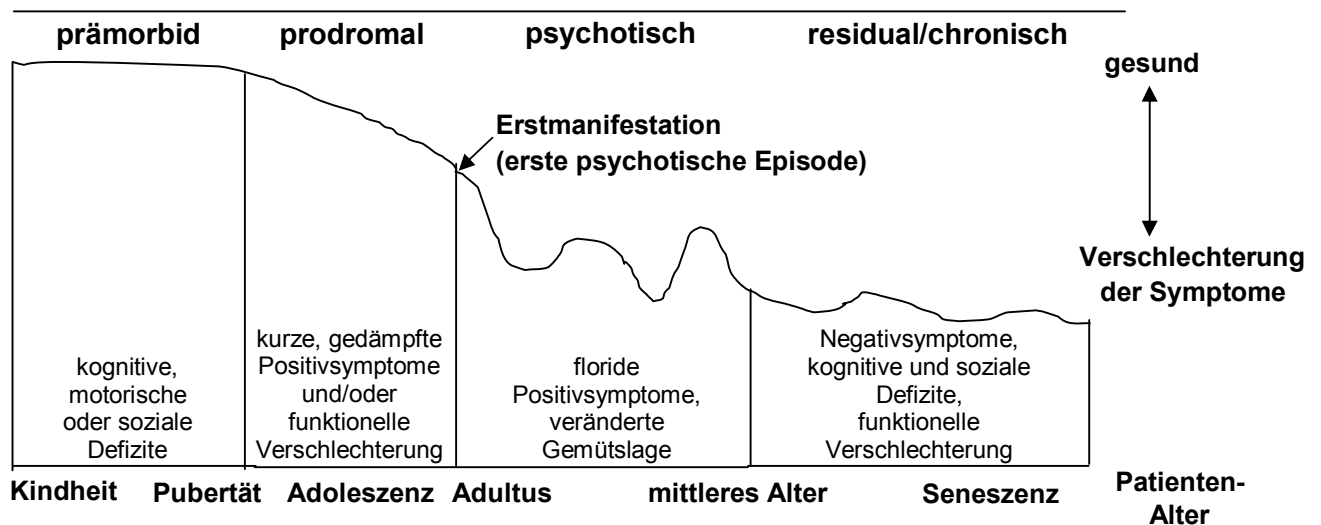
Dysphorie, Angst, Depression, Reizbarkeit, Suizidalität

2.1.6 Klinischer Verlauf

Die Schizophrenie wird nicht nur durch eine heterogene Symptomatik, sondern auch durch differente Formen des Krankheitsverlaufs charakterisiert. Der Krankheitsbeginn verläuft entweder langsam und schleichend oder setzt plötzlich ein und kann durch prämorbid Faktoren begünstigt werden (LEWIS & LIEBERMAN, 2000). Im Fall eines langsamen Beginns lassen sich, wie in Abbildung 2 dargestellt, vier verschiedene Phasen des Krankheitsverlaufs unterscheiden: prämorbid Phase, Prodromalphase, akute Phase mit florider Symptomatik und Residualphase (LEWIS & LIEBERMAN, 2000; TANDON et al., 2009). Während der prämorbid Phase, die sich von der pränatalen Entwicklung über die Kindheit bis zur Adoleszenz ziehen kann (s. Abb. 2), treten Anomalitäten in der Gehirnentwicklung sowie subtile, unspezifische kognitive, motorische und/oder soziale Beeinträchtigungen auf, z. B. Aufmerksamkeitsschwierigkeiten, sozialer Rückzug oder emotionale Distanzierung (LEWIS & LIEBERMAN, 2000; TANDON et al., 2009). In der sich anschließenden Prodromalphase, welche der Erstmanifestation der Erkrankung vorangeht (vgl. Abb. 2) und einige Monate bis Jahre andauern kann (OLBRICH et al., 2004, TANDON et al., 2009), zeigen sich unterschwellige Positivsymptome wie Aberglaube, leichte Stimmungsveränderungen, z. B. ungewohnte Launenhaftigkeit, kognitive Einbußen, u. a. Konzentrationsstörungen, sozialer Rückzug wie auch Zwangsverhalten (LEWIS & LIEBERMAN, 2000). Nach einem scheinbar auslösenden, häufig relevanten (Lebens-) Ereignis, beispielsweise Auszug aus dem Elternhaus, Todesfall in der Familie, das sich möglicherweise als Stressfaktor auf vulnerable neuronale Schaltkreise auswirkt (LEWIS & LIEBERMAN, 2000), manifestiert sich die Erkrankung erstmals mit akuten (floriden) psychotischen Symptomen wie Wahn, Halluzinationen und Denkstörungen (s. u. Abb. 2); dieser Krankheitsschub kann mehrere Wochen bis Monate anhalten. Danach bleiben die psychotischen Symptome in einem „Schwebezustand“ und können leicht erneut in Erscheinung treten (TANDON et al., 2009). Meist tritt nach dem Abklingen der akuten Symptome die in Abbildung 2 verdeutlichte Residualphase ein, die häufig von einer

starken Negativsymptomatik sowie kognitiven Defiziten oder Störungen der Psychomotorik geprägt ist (OLBRICH et al., 2004) und entweder konstant bleibt oder nach jeder akuten Phase stärker wird (DEISTER & MÖLLER, 1998). Besonders die ersten Krankheitsjahre zeichnen sich durch eine zunehmende Verschlechterung der Symptomatik aus bis oftmals ein Plateau erreicht wird, welches in einer Remission oder einer chronischen Erkrankung resultiert (TANDON et al., 2009).

Abb. 2: Klinischer Langzeitverlauf der Schizophrenie



(in Anlehnung an LEWIS & LIEBERMAN, 2000 und TANDON et al., 2009)

Das voranstehende Schaubild repräsentiert den im Text erläuterten Langzeitverlauf einer Schizophrenie-Erkrankung mit seinen vier klinischen Phasen - prämorbid, prodromal, psychotisch und residual bzw. chronische Phase - sowie der damit assoziierten, verschiedenartig ausgebildeten Symptomatik. Zusätzlich sind die Altersabschnitte des Patienten angegeben, um zu kennzeichnen, wann in etwa die einzelnen Phänomene im Laufe des Lebens des Patienten auftreten. Das Diagramm macht deutlich, dass sich die Symptome seit Beginn der prodromalen Phase verschlechtern und erst nach einer besonders deutlichen Zunahme in der psychotischen Phase schließlich ein mehr oder weniger stabiles Plateau in der residualen/chronischen Phase erreichen.

Eine Verlaufs- bzw. Ausgangsprognose ist nur sehr eingeschränkt möglich, da der Ausgang von diversen Variablen, wie Krankheitsdauer, therapeutischen und Umgebungsfaktoren, beeinflusst wird. Generell zeigen Schizophrenie-Patienten eine fast doppelt so hohe Mortalitätsrate im Vergleich zur gesunden Bevölkerung, eine hohe Suizidgefährdung (etwa 5 % der Patienten sterben durch Suizid) sowie erhebliche Beeinträchtigungen der Lebensqualität (TANDON et al., 2009). Ferner leiden ca. 50 - 80 % bzw. 20 - 40 % der stationär bzw. ambulant behandelten Schizophrenie-Patienten an

komorbiden Erkrankungen (WOBROCK et al., 2004) und auch diverse weitere psychiatrische Störungen, besonders häufig Suchterkrankungen, können zusätzlich zur schizophrenen Symptomatik auftreten (OLBRICH et al., 2004).

2.1.7 Diagnose und Differentialdiagnose

Die Definition der Schizophrenie wurde aufgrund ihrer starken Heterogenität bezüglich Ätiologie, Pathophysiologie, Symptomatik und Verlauf sowie wegen ihrer zum Teil schwierigen Abgrenzung gegenüber anderen psychiatrischen Erkrankungen im Laufe des letzten Jahrhunderts vielfach überarbeitet und neu beschrieben und bis heute ist die Komplexität der Schizophrenie nur unvollständig verstanden (TANDON et al., 2008a, 2009, 2013). Die zwei operationalisierten Klassifikationssysteme ICD-10 und DSM-5, welche exakt festgelegte Kriterien und Regeln für die psychiatrische Diagnostik liefern und eine Kombination aus klinischer Tradition, Grundlagenwissen wie auch aktueller Forschungsdaten darstellen (DEISTER & MÖLLER, 1998), dienen heute als Basis der Diagnose einer Schizophrenie. Die Diagnosestellung erfolgt auf der Basis standardisierter Interviews, in denen das Vorliegen der schizophrenen Symptomatik systematisch vom Patienten oder betreuenden Personen abgefragt wird (SARTORY, 2007). Die Differentialdiagnostik umfasst routinemäßig unter anderem eine allgemeine somatische Untersuchung, die Feststellung der Labor-Basisparameter (z. B. Blutbild, Leber-, Nierenwerte, Schilddrüsenhormone, HIV-Test) einschließlich Drogenscreening, eine Liquoruntersuchung zum Ausschluss möglicher entzündlicher Veränderungen, eine Elektrokardio- sowie -encephalographie zur Überprüfung von kardialen Ursachen bzw. Anfallsleiden und sowohl eine kraniale Computer- als auch eine Kernspintomographie, um Blutung, Infarkt und Tumor als Psychose-induzierenden Faktor exkludieren zu können (DEISTER & MÖLLER, 1998; OLBRICH et al., 2004).

Hinsichtlich der Differentialdiagnose gilt es, eine schizophrene Psychose gegenüber direkt oder indirekt das Gehirn betreffenden Krankheiten oder Störungen, welche ebenfalls derartige psychotische Zustände auslösen können, abzugrenzen. Dazu gehören auf der einen Seite primäre Erkrankungen des Zentralnervensystems wie ein Schädel-Hirn-Trauma oder zerebrale Gefäßerkrankungen. Auf der anderen Seite können schizophreniforme Psychosen auch sekundär entstehen - ausgelöst durch z. B. hirn beteiligende Erkrankungen (u. a. Vitamin-B12-Mangel, metabolische Störungen) oder

Substanz-induzierte Störungen, die beispielsweise durch Alkohol, Amphetamine oder Marihuana/Haschisch verursacht werden können (DEISTER & MÖLLER, 1998).

2.1.8 Mit einer Schizophrenie assoziierte biochemische und neuroanatomische Veränderungen

Die in Abschnitt 2.1.4 erläuterten genetischen sowie prä-, peri- und postnatal möglichen Einflussfaktoren auf das sich entwickelnde Gehirn können zahlreiche biochemische und neuroanatomische Veränderungen nach sich ziehen, welche die Basis der Vulnerabilität bilden und funktionell in einer Herabsetzung der Informationsverarbeitungsfähigkeit resultieren (WOBROCK et al., 2004). Auf der Grundlage des modernen *in vivo* Neuroimagings (z. B. CT = Computer- und MRT = Magnetresonanztomographie bzw. Kernspintomographie) ebenso wie anhand von *post mortem*-Untersuchungen wurde gezeigt, dass bei Schizophrenie-Patienten das Gehirnvolumen verringert ist (CAHN et al., 2002; KURACHI et al., 2003). Reduktionen verschiedener Gehirnstrukturen beziehen sich sowohl auf den Temporallappen, hier insbesondere auf den Hippokampus, die Amygdala und den Gyrus temporalis superior, als auch auf den präfrontalen Kortex (PFC), den Thalamus, das anteriore Cingulum sowie das Corpus callosum (LEWIS & LIEBERMAN, 2000; WOBROCK et al., 2004; KESHAVAN et al., 2008; HENZE et al., 2012). Darüber hinaus wurde eine geringere Dichte der grauen Substanz und somit eine reduzierte Anzahl von Nervenzellkörpern festgestellt (GUR et al., 1999; CAHN et al., 2002), die sich einerseits auf den medialen Temporallappen, andererseits auf den Gyrus temporalis superior bezieht (KESHAVAN et al., 2008) und aus einer anomalen Gehirnentwicklung *in utero* resultiert (GUR et al., 1999). Während die Reduktionen des Temporallappens mit Beeinträchtigungen des Gedächtnisses und die der weißen Substanz mit allgemeinen kognitiven Defiziten assoziiert sind, stehen die Gyrus-Veränderungen mit den schizophrenen Positivsymptomen in Zusammenhang (KESHAVAN et al., 2008). CAHN et al. (2006) konnten zudem beobachten, dass diejenigen Schizophrenie-Patienten, die während des ersten Erkrankungsjahres eine erheblich defizitäre graue Substanz aufwiesen, in einer Folgestudie fünf Jahre später die stärkste Ausprägung an Negativsymptomen zeigten. Von der mit der reduzierten weißen Substanz verbundenen gestörten neuronalen Vernetzung wird angenommen, dass diese zum einen auf eine fehlerhafte Expression Myelin-assoziiierter Gene, zum anderen auf Defizite in der Entwicklung und Funktion der Oligodendrozyten zurückzuführen ist, welche wiederum durch eine beeinträchtigte

Expression von Neuregulin-1 bedingt wird (KESHAVAN et al., 2008). Ferner konnte in Schizophrenie-Patienten mit Hilfe von MRT-Aufnahmen eine Erweiterung der lateralen Hirnventrikel, des unpaarigen dritten Ventrikels sowie der Hirnfurchen (Sulci cerebri) detektiert werden (CAHN et al., 2002; OLBRICH et al., 2004). Außerdem wurde unter Einsatz weiterer bildgebender Verfahren wie PET (Positronen-Emissions-Tomographie) und SPECT (Einzelphotonen-Emissions-Computertomographie) eine um bis zu 8 % geringere Durchblutung des Frontalhirns wie auch ein verminderter Glukoseumsatz festgestellt (HILL et al., 2004; OLBRICH et al., 2004). Es wird davon ausgegangen, dass dieses als Hypofrontalität bezeichnete Phänomen, das v. a. den dorsolateral-präfrontalen Kortex (DLFC) betrifft, von genetischen Faktoren, wie Gen-Modifikationen der Catechol-O-Methyltransferase und des metabotropen Glutamatrezeptors bzw. deren Interaktion, induziert wird (WEINBERGER et al., 2001; KESHAVAN et al., 2008). Vor allem eine ausgeprägte Hypofrontalität korreliert mit einer deutlichen Negativsymptomatik, Chronizität, psychomotorischen wie auch kognitiven Defiziten und folglich mit einer reduzierten dopaminergen Aktivität (OLBRICH et al., 2004; WOBROCK et al., 2004). Neben einer mangelnden Proliferation der Gliazellen wurden zytoarchitektonische Anomalitäten sowohl kortikaler (entorhinaler Kortex) als auch limbischer Gehirnstrukturen (Hippokampus) detektiert, die sich auf eine gestörte (pränatale) neuronale Migration zurückführen lassen und in einer defizitären Konnektivität des neuronalen Netzwerks resultieren (WOBROCK et al., 2004; KESHAVAN et al., 2008). Weiterhin zählen zu den neuropathologischen Veränderungen, die mit einer Erkrankung an Schizophrenie einhergehen und die von besonderem Interesse für die vorliegende Arbeit waren, sowohl der unten näher beschriebene Verlust von Interneuronen in bestimmten Gehirnarealen als auch die primär für kortikale Pyramidenzellen (GAREY et al., 1998; GLANTZ & LEWIS, 2000; Sweet et al., 2010), aber auch für den Hippokampus (ROSOKLIJA et al., 2000) publizierte verringerte Anzahl synaptischer Dornfortsätze und das kortikale Defizit neuronaler Dendriten (BROADBELT et al., 2002).

Auf biochemischer Ebene wird die Schizophrenie als komplexe „Netzwerkkrankheit“ verstanden, was bedeutet, dass diverse Neurotransmittersysteme und damit neuronale Vernetzungen gestört sind bzw. im Ungleichgewicht zueinander stehen. In Bezug auf das dopaminerge Transmittersystem wurde die sogenannte Dopamin (DA)-Hypothese aufgestellt, die einerseits von einer Überaktivität (Hyperfunktion) des mesolimbischen DA-Systems und einer daraus resultierenden Hyperstimulation der DA-D₂-Rezeptoren als Ursache der Positivsymptomatik ausgeht (z. B. LARUELLE, 2000; GUILLIN et al., 2007;

KESHAVAN et al., 2008). Das mesolimbische DA-System, das schematisch unten in Abbildung 3 dargestellt ist, erstreckt sich zwischen dem ventralen Tegmentum (Area tegmentalis ventralis, engl. ventral tegmental area, VTA) und limbischen Strukturen wie dem Nukleus accumbens (NAcc) im ventralen Bereich des Striatums, dem Hippokampus und der Amygdala (GUILLIN et al., 2007). Gestützt wird diese Annahme zum einen durch die Tatsache, dass u. a. auf das DA-System einwirkende Substanzen wie Amphetamin, das eine präsynaptische DA-Freisetzung bei gleichzeitiger Inhibition der Wiederaufnahme des Botenstoffs aus dem synaptischen Spalt hervorruft, in gesunden Menschen psychotische Symptome auslösen und in geringer Dosierung diese Symptomatik in Schizophrenie-Patienten verstärken (LARUELLE, 2000; LEWIS & LIEBERMAN, 2000; GUILLIN et al., 2007). Zum anderen beruht die antipsychotische Wirkung primär der klassischen bzw. typischen Neuroleptika wie Haloperidol (vgl. Abschnitt 2.1.9) auf einer Blockade der DA-Rezeptoren (primär D₂) (GUILLIN et al., 2007; KESHAVAN et al., 2008). Auch das Phänomen der Verhaltenssensitivierung, auf das in Zusammenhang mit den pharmakologischen Tiermodellen in Abschnitt 2.2.1 eingegangen wird, beruht auf der Annahme einer Hyperfunktion bzw. Sensibilisierung des mesolimbischen DA-Systems (LARUELLE, 2000; GUILLIN et al., 2007; PELEG-RAIBSTEIN et al., 2008).

Wie oben bereits kurz angesprochen, besagt die DA-Hypothese andererseits, dass eine Unterfunktion des mesokortikalen DA-Systems, d. h. eine dopaminerge Hypoaktivität im Frontalhirn, und eine daraus folgende Hypostimulation der DA-D₁-Rezeptoren mit der Ausbildung der schizophrenen Negativsymptome wie auch kognitiver Beeinträchtigungen einhergeht (GUILLIN et al., 2007; KESHAVAN et al., 2008). Wie in Abbildung 3 skizziert, entspringt die mesokortikale DA-Bahn ebenfalls dem VTA und zieht in kortikale Areale, u. a. in den medialen und dorsolateral-präfrontalen sowie den temporalen Kortex (GUILLIN et al., 2007).

Da das DA-System in enger Wechselwirkung mit anderen Transmittersystemen, wie dem glutamatergen System steht (GALLINAT & GUDLOWSKI, 2008), etablierte sich außerdem die Glutamathypothese der Schizophrenie. Diese postuliert eine Hypofunktion des kortikostriatalen sowie des kortikomesolimbischen glutamatergen Systems, welche ebenfalls in die Entwicklung der positiven, aber auch der negativen und kognitiven Symptome involviert ist (LEWIS & LIEBERMAN, 2000; WOBROCK et al., 2004). Begründen lässt sich die Glutamathypothese damit, dass Phencyclidin, ein nicht-kompetitiver Antagonist des glutamatergen N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptors (NMDA-), ebenso wie dessen Derivat Ketamin einerseits in gesunden Menschen nicht nur Schizophrenie-

typische positive, sondern auch negative und kognitive Symptome auslösen und andererseits in Schizophrenie-Patienten diese Symptomatik verschlimmern (LEWIS & LIEBERMAN, 2000; COYLE et al., 2003; GALLINAT & GUDLOWSKI, 2008). Diese induzierte Unterfunktion der NMDA-Rezeptoren führt einerseits über die zwischengeschalteten ebenfalls hypostimulierten GABAergen (engl. gamma-aminobutyric acid, γ -Aminobuttersäure) Interneurone zu einer Disinhibition der DA-Neurone des VTA und daraus folgend zu einer gesteigerten mesolimbischen DA-Ausschüttung im NAcc (s. o.) (GALLINAT & GUDLOWSKI, 2008). Andererseits bewirkt die NMDA-Unterfunktion eine verminderte Erregung anderer DA-Nervenzellen im VTA, deren Efferenzen als mesokortikale Bahn zurück zum PFC verlaufen und demnach eine reduzierte DA-Aktivierung (Hypoaktivität) im PFC mit sich bringen (LEWIS & LIEBERMAN, 2000; GALLINAT & GUDLOWSKI, 2008). Dennoch kann die Unterfunktion der NMDA-Rezeptoren eine übermäßige kompensatorische Glutamat-Freisetzung hervorrufen, durch die wiederum andere nicht antagonisierte glutamaterge Rezeptor-Subtypen in frontalen Gehirnbereichen überaktiviert werden (LEWIS & LIEBERMAN, 2000; WOBROCK et al., 2004), was mit der *post mortem* präfrontal detektierten erhöhten Dichte an Kainat-Rezeptoren (GALLINAT & GUDLOWSKI, 2008) in Einklang steht. Im Gegensatz dazu wurde in Strukturen des medialen Temporallappens, z. B. im Hippokampus, *post mortem* eine verringerte Dichte der Kainat- und AMPA-Rezeptoren (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-Isoxazolpropionat) nachgewiesen (WOBROCK et al., 2004; GALLINAT & GUDLOWSKI, 2008). Diese Alterationen des Glutamat-Systems werden auf ein gestörtes synaptisches Pruning (Eliminierung von Synapsen) zurückgeführt (WOBROCK et al., 2004), was wiederum mit der oben erwähnten Reduktion synaptischer Dornfortsätze vereinbar ist. Gemäß REYNOLDS & HARTE (2007) liegt darüber hinaus ein genetisch bedingtes striatales wie auch hippokampales Defizit des vesikulären Glutamat-Transporters-1 in Schizophrenie-Patienten vor.

Post mortem-Gehirnanalysen von Schizophrenie-Patienten weisen ferner auf Anomalien des GABAergen Transmittersystems hin (BEASLEY et al., 2002; REYNOLDS & HARTE, 2007), welches, wie vorhergehend angesprochen, mit dem glutamatergen und dopaminergen System interagiert. Diesbezüglich ist der Literatur einheitlich ein Verlust GABAerger Interneurone im PFC, speziell im für die kognitive Funktionalität verantwortlichen dorsolateralen Bereich, wie auch im Hippokampus zu entnehmen (LEWIS et al., 1999; ZHANG & REYNOLDS, 2002). Dabei wird deutlich, dass sich das Defizit auf spezifische neuronale Subpopulationen, nämlich primär auf Parvalbumin- (PV) aber auch auf Calbindin-exprimierende GABAerge Interneurone bezieht (BEASLEY et al., 2002; REYNOLDS

& HARTE, 2007). Des Weiteren wurden im DLFC von Schizophrenie-Kranken nicht nur Reduktionen der Glutamat-Decarboxylase 67 (67 Kilodalton-Isoform), einem Enzym, das die GABA-Synthese katalysiert, sowie deren mRNA-Konzentration (engl. messenger ribonucleic acid, Boten-Ribonukleinsäure (mRNS)) nachgewiesen (LEWIS et al., 1999, 2005, 2012; SWEET et al., 2010), sondern auch des membranalen GABA-Transporters 1 (GAT1), der für die Wiederaufnahme von freigesetztem GABA in die Nervenendigungen verantwortlich ist (VOLK & LEWIS, 2002; LEWIS et al., 2005). In Folge der verringerten GABA-Ausschüttung kommt es zu einer Hochregulation von postsynaptischen GABA_A-Rezeptoren (LEWIS et al., 1999; VOLK & LEWIS, 2002; SWEET et al., 2010). Es wird angenommen, dass es sich sowohl bei der Erhöhung der postsynaptischen GABA_A-Rezeptoren als auch bei der Abnahme des präsynaptischen GAT1 um kompensatorische Mechanismen handelt, die aus dem GAD67-Defizit resultieren (LEWIS et al., 2005, 2012). Diese Alterationen des GABAergen Transmittersystems bedingen aufgrund der verminderten inhibitorischen Kontrolle der Pyramidenzellen eine fehlerhafte Informationsverarbeitung und tragen dadurch zu den positiven, negativen sowie kognitiven Symptomen der Schizophrenie bei (VOLK & LEWIS, 2002).

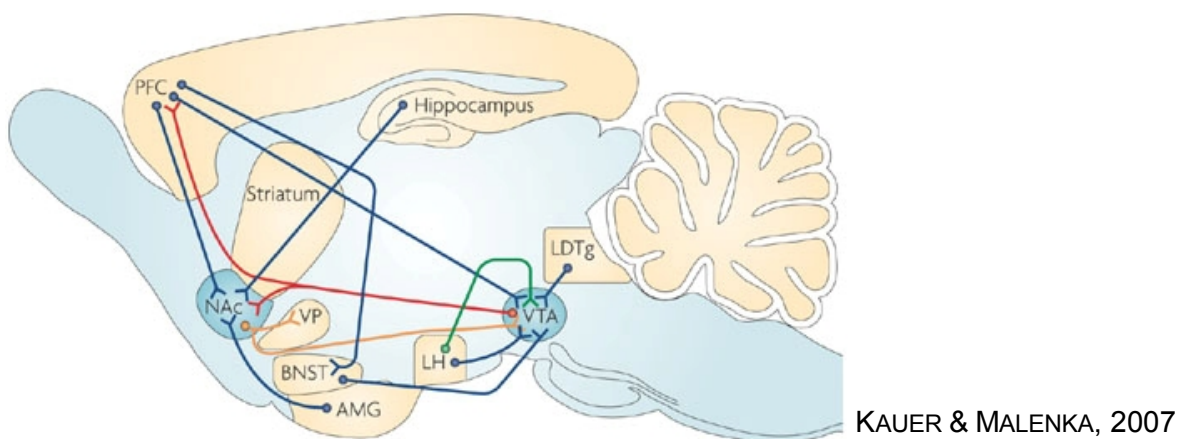
Da Halluzinogene, z. B. Lysergsäurediethylamid (LSD), agonistisch an Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT)-Rezeptoren wirken und in gesunden Menschen psychotische Symptome wie Gedankenstörungen und Halluzinationen auslösen, geht man davon aus, dass auch das serotonerge Transmittersystem an der Entwicklung einer Schizophrenie beteiligt ist (OLBRICH et al., 2004; WOBROCK et al., 2004; REMSCHMIDT & THEISEN, 2011). Diese Serotonin-Hypothese wird zum einen dadurch gestützt, dass atypische Antipsychotika wie Clozapin neben ihrem primären Effekt auf das DA-System u. a. auch antagonistisch an Serotonin-Rezeptoren (5-HT_{2A} und 5-HT_{2C}) wirken (OLBRICH et al., 2004; REMSCHMIDT & THEISEN, 2011; FREISSMUTH et al., 2012). Zum anderen verdeutlichen *post mortem*- bzw. Rezeptorbindungsuntersuchungen ein übermäßiges Vorhandensein des Transmitters (FREISSMUTH et al., 2012) sowie eine verringerte Dichte an serotonergen 5-HT_{1A}- und 5-HT_{2A}-Rezeptoren im PFC (WOBROCK et al., 2004; REMSCHMIDT & THEISEN, 2011). Daraus folgend erfahren subkortikale DA-Neurone eine erheblich geringere serotonerge Inhibition über den PFC, was wiederum zu einer dopaminergen Hyperaktivierung führt (WOBROCK et al., 2004).

Zumindest bei einer Subgruppe von Schizophrenie-Patienten ist außerdem auch das Acetylcholin-System in die Pathologie involviert (SEVERANCE & YOLKEN, 2008, SCARR et al., 2009; JONES et al., 2012). So wurde einerseits im Hippokampus, Kortex und Thalamus von

Schizophrenie-Kranken eine verminderte Aktivität des nikotinergen α_7 -Acetylcholin-Rezeptors, der am sensorischen Gating beteiligt ist und bezüglich der kognitiven Defizite der Schizophrenie eine Rolle spielt, festgestellt (SEVERANCE & YOLKEN, 2008). SEVERANCE und YOLKEN (2008) stellten fest, dass bei einer Erkrankung an Schizophrenie die Transkription des α_7 -Acetylcholin-Rezeptors verändert ist und wiesen darüber hinaus ein Defizit einer bestimmten α_7 -Isoform im PFC sowie im Corpus callosum nach. Andererseits konnte eine selektive Reduktion des muskarinergen Acetylcholin-Rezeptors 1 im DLFC einiger Schizophrenie-Patienten detektiert werden, welche ebenfalls mit Einbußen der Kognition assoziiert ist (SCARR et al., 2009). Präklinische Studien belegen einen Antipsychotikum-ähnlichen Effekt und/oder eine kognitive Verbesserung in Folge einer Aktivierung spezifischer muskarinerge (M_1 , M_2) und nikotinerge (α_7 , $\alpha_2\beta_4$) Acetylcholin-Rezeptor-Subtypen (JONES et al., 2012). In Übereinstimmung damit wurde gezeigt, dass Antagonisten der entsprechenden Rezeptoren, wie z. B. Scopolamin, in Schizophrenie-Patienten bestehende positive und kognitive Symptome verschlimmern und in gesunden Menschen Psychosen induzieren (JONES et al., 2012).

Die vielfältigen, miteinander interagierenden biochemischen Alterationen machen deutlich, dass die mit einer Schizophrenie assoziierte Symptomatik auf Dysbalancen multipler, wenn nicht sogar aller Neurotransmittersysteme zurückzuführen ist.

Abb. 3: Schematische Darstellung des mesolimbischen und mesokortikalen DA-Systems



Zu sehen ist ein stark vereinfachtes Schema des mesolimbischen und mesokortikalen DA-Systems (rote Projektionen) sowie der glutamatergen (blau) kortiko-meso-limbischen Projektionen. Laut der DA-Hypothese liegt eine DA-D₂-Rezeptor-vermittelte Hyperfunktion des mesolimbischen DA-Systems vom ventralen Tegmentum (VTA) u. a. zum Nukleus accumbens (NAc) der schizophrenen Positivsymptomatik zugrunde. Und eine auf den DA-D₁-Rezeptoren beruhende Hypofunktion des mesokortikalen DA-Systems vom VTA in kortikale Areale ist in die Ausbildung der schizophrenen Negativsymptomatik und der kognitiven Defizite

involviert. Gemäß der Glutamat-Hypothese spielt v. a. die Hypoaktivität des kortikalen Glutamat-Systems bei der Entwicklung der positiven, negativen und kognitiven Schizophrenie-Symptome eine wesentliche Rolle. Bedingt durch eine Unterfunktion der glutamatergen NMDA-Rezeptoren kommt es im VTA einerseits zu einer reduzierten glutamatergen Stimulation der mesokortikalen DA-Bahn, andererseits zu einer erhöhten Aktivierung des mesolimbischen DA-Trakts. AMG: Amygdala, BNST: Bed Nukleus, Stria terminalis, LDTg: latero-dorsaler tegmentaler Nukleus, LH: lateraler Hypothalamus, PFC: präfrontaler Kortex, VP: ventrales Pallidum, orange = GABAerge Projektionen, grün = orexinerge Projektionen (Orexin A und B = Neuropeptid-Hormone, Bildung im Hypothalamus).

Da etwa 90 % der exzitatorischen Synapsen auf den Köpfen synaptischer Dornfortsätze lokalisiert sind und sich demnach auch zahlreiche Glutamat- sowie andere Rezeptoren hier befinden, sind die Dornfortsätze neuronaler Dendriten für die korrekte synaptische Transmission und interneuronale Konnektivität von immenser Bedeutung. Aufgrund ihres Aufbaus und ihrer Funktion, beides in Kapitel 2.4 näher erläutert, sind die synaptischen Dornfortsätze in die zuvor ausgeführten biochemischen Veränderungen bei Schizophrenie involviert. Auf ihre pathologischen Alterationen im Zuge der Erkrankung wird in Abschnitt 2.4.3 gesondert eingegangen.

2.1.9 Therapeutische Maßnahmen

Aufgrund der multifaktoriellen Pathogenese sowie des meist langfristigen und wechselhaften Verlaufs einer schizophrenen Erkrankung, handelt es sich bei der therapeutischen Intervention generell um einen mehrdimensional orientierten Gesamtbehandlungsplan, der auf das jeweilige Individuum und die aktuelle Erkrankungsphase (akut-psychotisch, postakut-residual, (partielle) Remission) bzw. die jeweils vorherrschende Symptomatik (positiv, negativ, kognitiv, sozial) anzupassen ist (DEISTER & MÖLLER, 1998; GAEBEL & FALKAI, 1998) und sich aus den Komponenten Pharmako-, Psycho- und Soziotherapie zusammensetzt (MÜLLER & RIEDEL, 2002). In diesem Zusammenhang sind die möglichst frühzeitige Behandlung florider Symptome der akuten Krankheitsphase, die Rückfallprophylaxe wie auch diverse Präventions- und Rehabilitationsmaßnahmen eng miteinander verbunden, um einer Chronifizierung der Erkrankung entgegenzuwirken (GAEBEL & FALKAI, 1998). Während der Akutphase der Schizophrenie steht die Pharmakotherapie im Mittelpunkt, wobei die seit Anfang der 50er Jahre des 20. Jahrhunderts verfügbaren Antipsychotika die Behandlung der Schizophrenie revolutioniert haben (SARTORY, 2007). Die damals entdeckten typischen bzw. klassischen Antipsychotika (zuerst Chlorpromazin), auch Antipsychotika der ersten Generation

genannt (LIEBERMAN, 2004) blockieren postsynaptische DA-D₂-Rezeptoren im limbischen System und im frontalen Kortex (DEISTER & MÖLLER, 1998). Dadurch ist es zwar möglich, die akute Positivsymptomatik der Schizophrenie erfolgreich zu behandeln, jedoch zeigen diese Medikamente kaum verbessernde Effekte auf negative und kognitive Symptome (LIEBERMAN, 2004). Da die D₂-Rezeptoren zudem in allen Gehirnarealen identisch sind (MÜLLER, 2002) und die Antipsychotika nicht spezifisch im limbischen System ihre Wirkung entfalten, werden auch in anderen Gehirnarealen D₂-Rezeptoren blockiert, woraus die mit den klassischen Antipsychotika assoziierten Nebenwirkungen resultieren (MÜLLER, 2002; MÜLLER & RIEDEL, 2002). Neben einem über die tuberoinfundibularen Projektionen (vom Hypothalamus zur Hypophyse) vermittelten Prolaktin-Anstieg und der u. U. daraus folgenden sexuellen Dysfunktion treten aufgrund der D₂-Rezeptorblockade im nigrostriatalen System primär extrapyramidal-motorische Bewegungsstörungen auf, welche eine akute Dyskinesie, eine Akathisie (krankhafte Bewegungsunruhe) sowie das Antipsychotikum-induzierte Parkinsonoid (Rigor, Tremor, Akinesie) und zum Teil irreversible Spätdyskinesien beeinhaltend können (MÜLLER, 2002; MÜLLER & RIEDEL, 2002; LIEBERMAN, 2004). Diese unerwünschten Begleiterscheinungen der typischen Antipsychotika wirken sich negativ auf die Therapietreue (Compliance) der Patienten aus (MÜLLER & RIEDEL, 2002), welche jedoch im Gesamtbehandlungsplan eine entscheidende Rolle spielt. Mit der Etablierung der atypischen Antipsychotika, d. h. der Antipsychotika der zweiten Generation (LIEBERMAN, 2004), Anfang der 90er Jahre des 20. Jahrhunderts nahm die Compliance zu, was einerseits darauf zurückzuführen ist, dass die Atypika bei unverändertem Effekt auf die Positivsymptomatik mit erheblich weniger Nebenwirkungen, v. a. bezüglich der extrapyramidalen Motorik, verbunden sind (MÜLLER, 2002; MÜLLER & RIEDEL, 2002). Zu den unerwünschten Begleiterscheinungen der Atypika zählen v. a. das Risiko kardiometabolischer Probleme (z. B. Gewichtszunahme, Diabetes mellitus, kardiovaskuläre Erkrankungen) sowie deren teilweise sedierende Wirkung via Bindung an muskarinerge M₁-, histaminerge H₁- und/oder adrenerge α_1 -Rezeptoren (ÜÇÖK & GAEBEL, 2008; STAHL, 2013). Andererseits zeigen diese neueren Medikamente aufgrund ihrer Bindungsaffinität zu den anderen Rezeptortypen (LIEBERMAN, 2004) eine bessere Wirksamkeit gegenüber den negativen und kognitiven Schizophrenie-Symptomen und im Fall von Clozapin einen therapeutischen Effekt bei denjenigen Patienten, die auf klassische Antipsychotika nicht ansprechen (MÜLLER, 2002; MÜLLER & RIEDEL, 2002). Zwar handelt es sich bei den atypischen Antipsychotika ebenfalls um DA-D₂-Rezeptor-Antagonisten, allerdings ist ihre Einwirkung auf das mesolimbische DA-System

ausgeprägter als ihr Einfluss auf das nigrostriatale DA-System, so dass man von einem eher selektiven Effekt der Atypika auf das mesolimbische System sprechen kann (MÜLLER, 2002). Ferner besitzen die atypischen Substanzen verglichen mit den typischen Antipsychotika nicht nur eine weitaus geringere Bindungsaffinität zu den D₂-Rezeptoren, sondern auch eine schnellere Dissoziation von ihnen (LIEBERMAN, 2004), was insgesamt als „loose binding“ („lockere Bindung“) bezeichnet wird (MÜLLER, 2002). Ein weiteres positives Kriterium der Atypika ist ihr starker Antagonismus an serotonergen 5-HT_{2A}-Rezeptoren des nigrostriatalen Systems (MÜLLER, 2002). Dieser antagonistische Effekt resultiert in einer Aufhebung der serotonergen Inhibition der entsprechenden dopaminergen Neurone und somit in einer verminderten Hemmung des nigrostriatalen Systems, was wiederum die günstige Wirkung dieser Substanzen auf die extrapyramidale Motorik erklärt (MÜLLER, 2002). Eine Linderung der Negativsymptomatik verschaffen die Atypika aufgrund der dopaminergen Aktivitätssteigerung im PFC, welche ebenfalls auf einer Beeinflussung des serotonergen Transmittersystems (teilweise via 5-HT_{1A}-Rezeptoren) basiert (LIEBERMAN, 2004). Zusätzlich gehen einige atypische Antipsychotika mit einem ausgeprägten Antagonismus an adrenergen α_1 -, zum Teil auch an α_2 -ezeptoren einher, was sich förderlich auf die kognitive Funktionalität auswirkt (MÜLLER, 2002).

Wie bereits oben erwähnt, sind neben der medikamentösen Behandlung auch psycho- und soziotherapeutische Interventionen von großer Bedeutung, um nicht nur die Symptome zu reduzieren bzw. den Patienten so weit wie möglich von diesen zu befreien und zu einer selbständigen Lebensführung zu befähigen, sondern auch um Rezidive zu verhindern, die Vulnerabilität und mögliche Stressoren zu minimieren und diesbezüglich die Bewältigungsfähigkeit (Coping) zu fördern sowie den Patienten auf kognitiver und psychosozialer Ebene zu rehabilitieren (GAEBEL & FALKAI, 1998). In diesem Zusammenhang ist es im Rahmen der sogenannten Psychoedukation essentiell, sowohl die erkrankte Person selbst in Form einer unterstützenden und verhaltensmodifizierenden Einzel- und/oder Gruppen-Psychotherapie als auch deren Angehörige im Zuge einer Familientherapie eingehend über die Krankheits- und Behandlungskonzepte aufzuklären und zu beraten. Darüber hinaus ist es gemäß der von GAEBEL und FALKAI (1998) redigierten „Behandlungsleitlinie Schizophrenie“ der DGPPN (Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie, Psychotherapie und Nervenheilkunde) unerlässlich, die an Schizophrenie erkrankte Person beispielsweise mit Hilfe einer Ergotherapie, der Strukturierung des Tagesablaufs, einer Verhaltenstherapie für die Vermittlung und Verbesserung sozialer und lebenspraktischer Fähigkeiten, eines kognitiven Trainings zur Verbesserung von

Funktionen wie Aufmerksamkeit und Gedächtnis (DEISTER & MÖLLER, 1998) sowie mittels beschützender Arbeitsplätze, Wohnangebote wie auch beruflicher (Wieder-) Eingliederungsprogramme zu unterstützen.

2.1.9.1 Pharmakotherapie mit Risperidon

Da das atypische Antipsychotikum Risperidon im Rahmen des hier durchgeführten Poly I:C-Versuchs Gegenstand der vorliegenden Dissertation war, soll nachfolgend kurz auf dessen Charakteristika eingegangen werden.

Hinsichtlich des Bindungsprofils zeigt Risperidon eine hohe Affinität gegenüber dopaminergen D_2 - und eine noch etwas höhere Neigung gegenüber serotonergen $5-HT_{2A}$ -Rezeptoren (SARTORY, 2007; STAHL, 2013). Ebenfalls stärker als an die D_2 -Rezeptoren bindet Risperidon an adrenerge α_1 - und auch α_{2C} - sowie an serotonerge $5-HT_7$ -Rezeptoren. Die darüber hinaus festgestellte antagonistische Wirkung an $DA-D_3$ - und D_4 -Rezeptoren ist allerdings schwächer als die an den D_2 -Rezeptoren (STAHL, 2013). Gemäß MÜLLER und RIEDEL (2002) bewirkt Risperidon eine deutliche Verbesserung der schizophrenen Positiv- und Negativsymptomatik bei gleichzeitig guter Verträglichkeit in Bezug auf die extrapyramidale Motorik. Den antipsychotischen Effekt entfaltet das Medikament allerdings besonders in niedriger Dosierung, während in hohen Dosen die Gefahr extrapyramidal-motorischer Bewegungsstörungen zunimmt, weshalb es in erster Linie in moderater Dosis z. B. bei jugendlichen Schizophrenie-Patienten verabreicht wird (STAHL, 2013). Zwar ist das Risiko einer Gewichtszunahme oder einer Störung des Fettstoffwechsels (Dyslipidämie) in Verbindung mit einer Einnahme von Risperidon relativ gering, jedoch kann die Substanz bereits in der bevorzugten moderaten Dosierung einen unerwünschten Anstieg des Prolaktinspiegels induzieren und wegen ihres starken Antagonismus an α_1 -Rezeptoren zu Sedierung führen (STAHL, 2013). Demnach sollten vor einer Pharmakotherapie mit Risperidon die Vor- und Nachteile der Behandlung bezogen auf den jeweiligen Patienten sorgfältig abgewogen werden (STAHL, 2013).

2.2 Präklinische Tiermodelle der Schizophrenie

2.2.1 Psychostimulans-basierte Modelle der Schizophrenie

2.2.1.1 Pharmakologische Induktion Schizophrenie-typischer Symptome mittels Amphetamin-Applikation

Im Amphetamin-Rattenmodell der Schizophrenie wird eine charakteristische Symptomatik mittels repetitiver Applikation des indirekten DA-Agonisten d-Amphetaminsulfat (AMPH) erzeugt. Die wiederholte und v. a. intermittierende Behandlung mit AMPH in geringer Dosierung induziert eine erhöhte Aktivität des mesolimbischen DA-Systems (s. u.) und daraus folgend u. a. lokomotorische Hyperaktivität sowie Beeinträchtigungen der Präpulsinhibition, wodurch sowohl ein Schizophrenie-typisches positives als auch ein kognitives Symptom simuliert wird (SWERDLOW et al., 1994; DAWE et al., 2009). Da mittels AMPH-Behandlung jedoch keine negativen Symptome, wie sozialer Rückzug, tierexperimentell generiert werden können, handelt es sich hierbei um ein unvollständiges Schizophrenie-Modell (DAWE et al., 2009). Aus verhaltenspharmakologischer Perspektive bewirkt die repetitive AMPH-Applikation eine lang anhaltende Sensitivierung, das bedeutet, eine gesteigerte Reaktion gegenüber den Psychomotorik stimulierenden Substanz-Effekten (SINGER et al., 2009). Diese äußert sich im Tiermodell, wie oben genannt, z. B. durch einen progressiven Anstieg der lokomotorischen Aktivität (Hyperlokomotion), der Wochen oder Monate nach dem Absetzen der Behandlung weiterhin nachweisbar ist (SINGER et al., 2009) als Antwort auf eine akute Substanz-Exposition in gleicher oder geringerer Dosierung (Challenge) (STEWART & BADIANI, 1993). Die Entwicklung und Expression der Hyperlokomotion (s. u.) können, wie in der vorliegenden Arbeit, mit Hilfe des Open Field-Tests verifiziert werden.

In Bezug auf Neuroanatomie und Biochemie bildet die DA-Hypothese der Schizophrenie (vgl. Abschnitt 2.1.8) die Grundlage des AMPH-Modells (KLINK et al., 2003). Als indirekter DA-Agonist bewirkt AMPH neben weiteren Effekten auf z. B. das noradrenerge Transmittersystem eine präsynaptische DA-Ausschüttung in den Extrazellularraum, vermittelt über eine Umkehrung des präsynaptischen DA-Transporters (DAT), bei gleichzeitiger Inhibition der Wiederaufnahme des Botenstoffs aus dem synaptischen Spalt (JONES et al., 1998; CADET et al., 2007). Diese pharmakologisch induzierte Steigerung der DA-Transmission bezieht sich auf das mesolimbische DA-System (STAHL, 2013). Die tierexperimentell erzeugte Hyperfunktion des mesolimbischen DA-Systems bildet nicht nur die Grundlage der oben beschriebenen Verhaltenssensitivierung, sondern spiegelt auch

die neurochemischen Anomalitäten als Ursache der humanen (positiven) Schizophrenie-Symptomatik wider (KLINK et al., 2003). Die Entwicklung bzw. Initiierung und die Expression der Sensitivierung stellen zwei zeitlich und anatomisch getrennte Komponenten dar (PIERCE & KALIVAS, 1997; RICHTAND, 2006; PHILLIPS et al., 2011). Dabei wird die Initiierung als transiente Abfolge Psychostimulans-induzierter zellulärer und molekularer Ereignisse verstanden, aus welcher die Expression der Sensitivierung in Form persistierender Veränderungen neuronaler Funktionen und daraus letztlich die Verstärkung eines spezifischen Verhaltens resultieren (PIERCE & KALIVAS, 1997). Die Initiierung der Sensitivierung geht mit einem erhöhten extrazellulären DA-Gehalt im VTA einher (KALIVAS 1995; PIERCE & KALIVAS, 1997). Da es sich beim VTA um den Ausgangspunkt des mesolimbischen sowie des mesokortikalen DA-Systems handelt, wird hier die Hirnregion hyperstimuliert, in der die Zellkörper der dopaminergen Neurone lokalisiert sind. Neben der Aktivierung der DA-D₁-Rezeptoren spielen hier auch die somatodendritischen DA-D₂-Autorezeptoren eine entscheidende Rolle, da diese infolge der stark erhöhten DA-Transmission desensitiviert werden und dadurch das Verbleiben des Neurotransmitters im synaptischen Spalt unterstützen (KALIVAS 1995; BJIJOU et al, 1996). Außerdem wird einerseits davon ausgegangen, dass durch die Stimulation von D₁-Rezeptoren die glutamaterge Übertragung im VTA stimuliert wird, welche wiederum die dopaminerge Hyperfunktion weiter verstärkt (KALIVAS 1995). Andererseits sind auch den NAcc stimulierende glutamaterge Projektionen aus dem PFC und der Amygdala an der Auslösung der Sensitivierung beteiligt (KALIVAS 1995; RICHTAND, 2006). Die Expression der Verhaltenssensitivierung beruht dagegen auf einer persistierenden erhöhten extrazellulären DA-Konzentration in den Hirnarealen der axonalen Endigungen, nämlich im NAcc (PIERCE & KALIVAS, 1997; RICHTAND, 2006) und im Striatum (KALIVAS, 1995; WOLF et al., 1995; RICHTAND, 2006). Auch für die Expression der Sensitivierung werden die Beteiligung einer erhöhten Glutamat-Transmission innerhalb des NAcc (PIERCE & KALIVAS, 1997; RICHTAND, 2006) sowie die gesteigerte Antwortbereitschaft von DA-D₁-Rezeptoren angenommen (ROBINSON et al., 1998; RICHTAND, 2006). Ferner geht man, gegensätzlich zum NAcc, für den PFC von einer reduzierten DA-Transmission aus, welche wiederum die mesolimbische (mesoaccumbale) DA-Ausschüttung aufgrund der fehlenden dopaminergen Inhibition glutamaterger kortikaler Efferenzen zum NAcc bzw. VTA stimuliert (KALIVAS, 1995). Gestützt wird das AMPH-Modell der Schizophrenie durch *in vivo* Neuroimaging-Untersuchungen, die eine erhöhte striatale DA-Freisetzung als Antwort auf eine akute AMPH-Gabe in medikamentös unbehandelten Schizophrenie-Patienten im

Vergleich zu gesunden Kontrollen zeigten (KLINK et al., 2003; PELEG-RAIBSTEIN et al., 2009).

Neben den biochemischen und daraus resultierenden verhaltensbiologischen Effekten ist eine subchronische AMPH-Behandlung auch mit morphologischen Alterationen verbunden. Dementsprechend wurden mit Hilfe der Golgi-Färbung bezüglich der distalen Dendriten der mittelgroßen, bedornten Neurone (engl. medium spiny neurons, MSNs) des NAcc signifikante Zunahmen sowohl der synaptischen Dornfortsätze insgesamt (ROBINSON & KOLB, 1997 + 1999; LI et al., 2003; SINGER et al., 2009) als auch speziell der verzweigten („branched“) Dornfortsätze, d. h. der Spines mit mehreren Köpfen, nachgewiesen (ROBINSON & KOLB, 1997 + 1999; LI et al., 2003). Auch hinsichtlich der distalen Dendriten der MSNs des Striatums (LI et al., 2003; SINGER et al., 2009) wie auch in Bezug auf die apikalen Dendriten der Pyramidenzellen des PFC (ROBINSON & KOLB, 1997 + 1999; SINGER et al., 2009) wurden signifikante Anstiege der Gesamt-Spinedichten festgestellt. Darüber hinaus wurden nach subchronischer AMPH-Behandlung verglichen mit unbehandelten Kontrollen signifikante Steigerungen der dendritischen Verzweigungen, d. h. der Dendritenanzahl, und der Dendritenlänge im NAcc (distale Dendriten) sowie im PFC (apikale Dendriten) detektiert (ROBINSON & KOLB, 1997 + 1999; SINGER et al., 2009). Im Gegensatz dazu wurden für den Parietal- und Okzipitalkortex signifikante Reduktionen der Gesamt-Spinedichte publiziert (ROBINSON & KOLB, 1997).

In Bezug auf die kortikalen GABAergen Interneurone, die, wie in Abschnitt 2.1.8 dargestellt, bei einer humanen Schizophrenie-Erkrankung ein Defizit vorweisen, fanden Morshedi & Meredith (2007) nach subchronischer AMPH-Gabe ebenfalls eine signifikante Abnahme der PV-positiven Interneuronpopulation im prälimbischen Kortex.

2.2.1.2 Pharmakologische Induktion Schizophrenie-typischer Symptome mittels Quinpirol-Applikation

Im Quinpirol-Modell der Schizophrenie werden krankheitstypische Symptome durch die repetitive, in der vorliegenden Arbeit konstant dosierte Behandlung mit Quinpirolhydrochlorid (Quinp.) generiert. Die chronische Verabreichung von Quinp. führt u. a. zu einer deutlichen lokomotorischen Sensitivierung sowie zu Zwangsverhalten in Form von Kontrollzwängen (DVORKIN et al., 2008). Daher wird die chronische Quinp.-Behandlung nicht nur für die Darstellung der schizophrenen Positivsymptomatik, sondern auch als präklinisches Modell der Zwangsstörung (engl. obsessive compulsive disorder)

genutzt (SULLIVAN et al., 1998; DVORKIN et al., 2008). Bei Quinp. handelt es sich um einen direkten Agonisten an DA-D₂- und D₃-Rezeptoren (SOKOLOFF et al., 1990), weshalb auch dieses Modell auf biochemischer Ebene auf der DA-Hypothese der Schizophrenie basiert. Hinsichtlich der Bindungsaffinität stellten SOKOLOFF und Kollegen (1990) fest, dass die DA-D₃-Rezeptoren eine 113-fach höhere Affinität gegenüber Quinp. besitzen als die D₂-Rezeptoren. GEHLERT et al. (1992) konnten anhand autoradiografischer Bindungsuntersuchungen zeigen, dass Quinp. mit hoher Dichte im Striatum und NAcc sowie im Tuberculum olfactorium einschließlich der Calleja-Inseln bindet, deren Körnerzellen über dopaminerge Afferenzen eng mit dem VTA verbunden sind und zahlreiche DA-D₃-Rezeptoren exprimieren (INTA et al., 2011). Ebenso wie die D₂-Rezeptoren sind auch die D₃-Rezeptoren nicht nur post-, sondern auch präsynaptisch lokalisiert und somit Autorezeptoren (SOKOLOFF et al., 1990; KOELTZOW et al., 2003), an welche sich Quinp. ebenfalls anlagert (STEWART & BADIANI, 1993). Dadurch kommt es zu einer reduzierten Sensitivität dieser (SULLIVAN et al., 1998; KOELTZOW et al., 2003), wodurch der inhibitorische Effekt der Autorezeptoren auf die DA-Ausschüttung blockiert und daraus folgend mehr DA synthetisiert und freigesetzt wird, was sekundär wiederum zu einer Stimulation von DA-D₁-Rezeptoren führt (ROWLETT et al., 1995; SULLIVAN et al., 1998). Neben der DA-Synthese wird durch eine chronische Behandlung mit Quinp. auch der DA-Metabolismus angeregt, welcher anhand der DOPAC-Konzentration (3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure = DA-Metabolit) nachweisbar ist (SULLIVAN et al., 1998). Beide Effekte sind aus bislang ungeklärten Gründen im Striatum stärker ausgeprägt als im NAcc (ROWLETT et al., 1995; SULLIVAN et al., 1998). Demnach beruht die im vorherigen Abschnitt eingehend erläuterte Verhaltenssensitivierung, die durch glutamaterge Afferenzen aus dem PFC und der Amygdala moduliert wird (SULLIVAN et al., 1998), auf neuronaler Ebene hier sowohl auf der verminderten Autorezeptor-Sensitivität innerhalb des VTA als auch auf einer Stimulation postsynaptischer DA-D₂- und D₃-Rezeptoren im NAcc und Striatum (STEWART & BADIANI, 1993).

Neben der Beeinflussung biochemischer Prozesse und den damit einhergehenden Verhaltensänderungen werden Quinp. ebenfalls morphologische Auswirkungen zugeschrieben. So konnten DVORKIN et al. (2008) nach einer subchronischen Behandlung mit Quinp. einerseits eine signifikante Abnahme der Gesamt-Spinedichte auf den apikalen und basalen Dendriten der Pyramidenneurone des medialen PFC (cingulärer Kortex Areal 3, Cg3), andererseits eine signifikante Zunahme der synaptischen Dornfortsätze apikaler und basaler Dendriten der Pyramidenneurone innerhalb des primären

somatosensorischen Kortex (Parietallappen) feststellen. Bezüglich der apikalen Cg3-Dendriten detektierten sie außerdem einen signifikanten Anstieg der Dendritenanzahl nach wiederholter Quinp.- verglichen mit Vehikelgabe.

2.2.2 Neuroentwicklungsbiologische Modelle der Schizophrenie

2.2.2.1 Neurotoxische Induktion Schizophrenie-typischer Symptome mittels Methylazoxymethanolacetat-Exposition *in utero*

Im Rahmen der multifaktoriellen Ätiopathogenese der Schizophrenie spielen pränatale Entwicklungsstörungen der neuronalen Konnektivität und Funktionalität eine entscheidende Rolle (vgl. Abschnitt 2.1.4). Im Fall des Methylazoxymethanolacetat-Rattenmodells der Schizophrenie werden derartige neuroentwicklungsbiologische Beeinträchtigungen mit Hilfe einer pränatalen Applikation des Neurotoxins und Kanzerogens Methylazoxymethanolacetat (MAM), hier am Trächtigkeitstag 17, tierexperimentell simuliert (CHIN et al., 2011; BROWN et al., 2013). MAM ist nicht nur eine die Mitose inhibierende Substanz, die durch DNA (engl. desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure)-Methylierung zum Absterben sich replizierender Zellen führt und damit die Neurogenese bzw. neuronale Entwicklung inhibiert (LAZAR et al., 2011), sondern auch ein Inhibitor der Neuritenausbildung (MATRICON et al., 2010). Die MAM-Exposition *in utero* induziert in den Nachkommen morphologische Gehirnveränderungen, die denen von Schizophrenie-Patienten entsprechen; dazu zählen u. a. die Vergrößerung des dritten und der lateralen Hirnventrikel (CHIN et al., 2011; BROWN et al., 2013) sowie Volumenreduktionen des Kortex (CATTABENI et al., 1989; GARBOSSA & VERCELLI, 2003; MOORE et al., 2006), des Hippokampus (MATRICON et al., 2010; CHIN et al., 2011; SANDERSON et al., 2012) und des Thalamus (MOORE et al., 2006; MATRICON et al., 2010). Durch die pränatale MAM-Behandlung werden vor allem im Hippokampus besonders gravierende zytoarchitektonische Schädigungen hervorgerufen. Hierbei handelt es sich um ektopische Neurone, d. h. Nervenzellen, die nicht an ihrem physiologischen, sondern einem für sie untypischen Ort lokalisiert sind. Dementsprechend wurden die Perikarya ektopischer Pyramidenzellen in den Strata radiatum und oriens nachgewiesen (SINGH, 1980; ASHWELL & WEBSTER, 1986), in denen unter physiologischen Bedingungen die axodendritischen Zellausläufer zu finden sind. In diesem Zusammenhang wurden auch häufige Lücken im Stratum pyramidale beobachtet (BARABAN et al., 2000). Die

deplatzierten Neurone gehen außerdem mit verkürzten, deformierten und zahlenmäßig reduzierten apikalen Dendritenästen sowie verringerten Spinezahlen einher (SINGH, 1980), wobei die zuletzt genannte Modifikation auch für korrekt lokalisierte hippocampale Pyramidenzellen und Körnerzellen des Gyrus dentatus (engl. dentate gyrus, DG) festgestellt wurde (SINGH, 1980).

Weitere Schizophrenie-typische Symptome, die mit Hilfe des MAM-Modells simuliert werden können (CHIN et al., 2011), sind einerseits kognitive Einbußen, die sich z. B. auf Aufmerksamkeit und Gedächtnis (BROWN et al., 2013), aber auch auf Präpulsinhibition sowie verschiedene Bereiche des Lernens beziehen (LAZAR et al., 2011). Andererseits kann die Negativsymptomatik im Sinne von beeinträchtigter sozialer Interaktion (MATRICON et al., 2010) wie auch die Positivsymptomatik anhand von Hyperlokomotion tierexperimentell nachgeahmt werden, wobei letztere auf eine dopaminerge Hyperfunktion zurückzuführen ist (LILLRANK et al., 1995; LAZAR et al., 2011). Ferner sind der Literatur MAM-induzierte Defizite der inhibitorischen PV-positiven (PV⁺) GABAergen Interneurone zu entnehmen, die u. a. sowohl den medialen PFC (mPFC) (LODGE et al., 2009; GASTAMBIDE et al., 2012) als auch den Hippokampus (PENSCHUCK et al., 2006; LODGE et al., 2009) betreffen und damit Schizophrenie-typische histologische Alterationen widerspiegeln (PENSCHUCK et al., 2006; GASTAMBIDE et al., 2012). Aus diesem Mangel an GABAerger Inhibition resultiert wiederum eine gesteigerte neuronale Erregbarkeit, wie beispielsweise in Form einer Hyperaktivität glutamaterger Pyramidenzellen des Hippokampus (PENSCHUCK et al., 2006; LODGE et al., 2009).

Als Limitation des MAM-Modells werden die im Vergleich zur humanen Erkrankung schwerwiegenderen und umfassenderen Alterationen von Verhalten und Anatomie angesehen (LILLRANK et al., 1995; BROWN et al., 2013). Trotz der Konformität bezüglich dopaminerger Dysregulation und kortikaler Beeinträchtigung kann die Applikation der antimitotischen Substanz weitere nicht-spezifische Störungen im Gehirn (z. B. reduzierte Größe des Striatums) und anderen Organen hervorrufen (LILLRANK et al., 1995; LAZAR et al., 2011). Dennoch sind derartige Tiermodelle unverzichtbar, um die Auswirkungen einer anomalen Gehirnentwicklung und gestörten Zellmigration auf die Entstehung einer Schizophrenie besser einschätzen zu können (LAZAR et al., 2011).

2.2.2.2 Immunologische Induktion Schizophrenie-typischer Symptome mittels pränataler Poly I:C-Behandlung

Das Polyinosin-Polycytidylsäure-Rattenmodell der Schizophrenie basiert auf der Aktivierung des maternalen Immunsystems während der Trächtigkeit infolge der Applikation des Immunstimulans Polyinosin-Polycytidylsäure (Poly I:C), hier am Trächtigkeitstag 15 (PIONTKEWITZ et al., 2009, 2011, 2012; ZUCKERMAN et al., 2003). Bei Poly I:C handelt es sich um eine synthetische Doppelstrang-RNA (engl. double-stranded RNA, dsRNA), die aus der Komplexierung der beiden Homopolymere Polyinosinsäure und Polycytidylsäure hervorgeht. dsRNA wird von vielen Viren im Zuge ihrer Replikation gebildet und stellt somit ein molekulares Muster einer Virusinfektion dar (ALEXOPOULOU et al., 2001). Daher wird Poly I:C als ein synthetisches Analogon viraler dsRNA eingesetzt, um die akute Phase einer Virusinfektion einschließlich der damit verbundenen Immunantworten tierexperimentell zu imitieren (ZUCKERMAN et al., 2003; MACÊDO et al., 2012). Nach der Erkennung der dsRNA durch den Toll-like Rezeptor 3 induziert die Rezeptor-Aktivierung eine intrazelluläre Signalkaskade, die zur Stimulation der Immunabwehr und zur Bildung proinflammatorischer Zytokine, v. a. von Typ-1-Interferonen führt (ALEXOPOULOU et al., 2001; MACÊDO et al., 2012). Folglich wird mit Hilfe des präklinischen Poly I:C-Modells die nachgewiesene Assoziation zwischen einer maternalen Virusinfektion während der Schwangerschaft und dem erhöhten Risiko der späteren Entwicklung von Schizophrenie in den Nachkommen simuliert (PIONTKEWITZ et al., 2009 + 2011). Wie im Zusammenhang mit der Ätiologie der humanen Erkrankung beschrieben (vgl. Abschnitt 2.1.4), stellt die Virus-Exposition *in utero* aufgrund der gravierenden Beeinträchtigungen der neurobiologischen Entwicklung einen Umwelt-Risikofaktor der Schizophrenie dar (MAKINODAN et al., 2008; TANDON et al., 2008b). Der genaue Mechanismus, durch den eine pränatale Virusinfektion zur latenten Pathologie des sich entwickelnden Zentralnervensystems führt, ist bislang nicht aufgeklärt, jedoch wird angenommen, dass v. a. die vom maternalen Immunsystem freigesetzten proinflammatorischen Zytokine hierbei eine entscheidende Rolle spielen (ZUCKERMAN et al., 2003). Diese können die Plazenta passieren, in den fetalen Blutkreislauf eindringen und somit den Zytokin-Spiegel des fetalen Gehirns beeinflussen (ZUCKERMAN & WEINER, 2003). Außerdem wurde anhand von *in vitro*- sowie *in vivo*-Studien gezeigt, dass Zytokine sowohl die Gehirnentwicklung regulieren als auch mit Nervenwachstumsfaktoren interagieren (ZUCKERMAN & WEINER, 2003). Verglichen mit einer Virusinfektion bietet die Verwendung von Poly I:C zwei wesentliche Vorteile. Zum einen entstehen weder

spezifische Antikörper noch virale Nukleinsäuren, zum anderen halten die direkten Poly I:C-Effekte für etwa 48 Stunden an, so dass diese präzise auf eine spezifische Phase während der fetalen Gehirnentwicklung abgestimmt werden können (ZUCKERMAN et al., 2003). Die Terminierung der Substanz-Applikation auf den Trächtigkeitstag 15 entspricht einerseits in etwa dem zweiten Trimester einer humanen Schwangerschaft (ZUCKERMAN et al., 2003), in welchem das sich entwickelnde Gehirn für eine schizophrene Prädisposition besonders empfänglich ist (TANDON et al., 2008b). Andererseits erfolgt zu diesem Entwicklungszeitpunkt die Neurogenese innerhalb des entorhinalen Kortex und Hippokampus - Hirnregionen, die bei einer Schizophrenie neuropathologische Alterationen aufweisen (ZUCKERMAN et al., 2003). Obwohl der Poly I:C-Insult den pränatalen Entwicklungsstörungen der Schizophrenie entsprechend bereits *in utero* gesetzt wird, sind die daraus folgenden Verhaltensänderungen, ebenso wie bei der humanen Erkrankung (vgl. Abb. 1 + 2), erst zeitlich verzögert in den adulten Nachkommen nachweisbar (PIONTKEWITZ et al., 2011), womit die Eignung des Poly I:C-Modells als neuroentwicklungsbiologisches Modell der Schizophrenie bestätigt wird (ZUCKERMAN et al., 2003). Zudem spiegelt dieses Rattenmodell zahlreiche neuropathologische Befunde wider, die für eine Erkrankung an Schizophrenie charakteristisch sind (PIONTKEWITZ et al., 2011). Mit Hilfe der *in vivo* Magnetresonanztomographie konnten eine Vergrößerung der lateralen Hirnventrikel sowie eine Volumenreduktion des Hippokampus in Poly I:C-exponierten Tieren detektiert werden (PIONTKEWITZ et al., 2009, 2011, 2012). Des Weiteren wurden Poly I:C-induzierte Reduktionen sowohl bezüglich der hippokampalen PV⁺ Interneurone als auch hinsichtlich der Körnerzellen des DG festgestellt (PIONTKEWITZ et al., 2012). Ferner zeigten sich in den hippokampalen Subregionen CA1 und CA3 (Cornu Ammonis, Ammonshorn), im DG sowie im ebenfalls zum limbischen System gehörigen entorhinalen Kortex morphologische Veränderungen in Form pyknotischer Neurone, wobei die CA1-Region davon am stärksten betroffen war (ZUCKERMAN et al., 2003). Da das subkortikale DA-System temporo limbische Afferenzen empfängt, geht man davon aus, dass die anatomischen Anomalien des entorhinalen Kortex und Hippokampus eine Hyperaktivität des subkortikalen DA-Systems bedingen, welche, wie in Abschnitt 2.1.8 erläutert, für Schizophrenie-Patienten bestätigt wurde (ZUCKERMAN et al., 2003). Auch der Befund einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber AMPH (Sensitivierung) im Zusammenhang mit einer gesteigerten striatalen DA-Ausschüttung in Poly I:C-Ratten stimmt damit überein (ZUCKERMAN et al., 2003; PIONTKEWITZ et al., 2009). In der Literatur wird darüber hinaus oftmals von einer Beeinträchtigung des Assoziationslernens in Form einer fehlenden

latenten Inhibition bei *in utero* Poly I:C ausgesetzten Tieren gesprochen (z. B. PIONTKEWITZ et al., 2009; ZUCKERMAN & WEINER, 2003; ZUCKERMAN et al., 2003), was gleichermaßen während der akuten psychotischen Phase in Schizophrenie-Patienten auftritt und ein kognitives Defizit darstellt (SWERDLOW et al., 1996; LUBOW, 2005).

Demzufolge ermöglicht die pränatale Poly I:C-Exposition die tierexperimentelle Simulation sowohl positiver als auch negativer und kognitiver Symptome der Schizophrenie (MACÊDO et al., 2012). Zwar berücksichtigt dieses Modell nicht die Beteiligung einer genetischen Komponente, jedoch kann auf dessen Grundlage einerseits der Effekt von Umwelt-Risikofaktoren, speziell von pränatalen Einflüssen, auf die Entstehung einer schizophrenen Erkrankung abgebildet (ZUCKERMAN et al., 2003) und andererseits die präklinische Entwicklung neuer Behandlungsstrategien vorangetrieben werden (MACÊDO et al., 2012).

2.2.3 Genetische Induktion Schizophrenie-typischer Symptome mittels Expression des mutierten humanen *DISC1*-Gens (disrupted-in-schizophrenia-1)

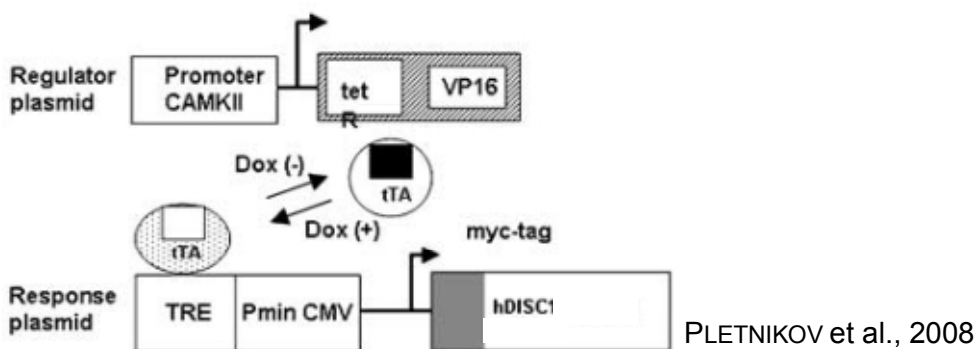
Die Ätiologie der Schizophrenie beruht auf multiplen Faktoren, wie der Interaktion zwischen bestimmten Vulnerabilitätsgenen und postnatalen Umwelteinflüssen (vgl. Abschnitt 2.1.4). Anhand genetischer Studien konnten verschiedene solcher Risikogene identifiziert werden, zu denen auch das *DISC1*-Gen (disrupted-in-schizophrenia-1) zählt, welches in die Neuro- und Synaptogenese, die neuronale Proliferation, Differenzierung und Migration sowie die Dendritenreifung involviert ist (SHEN et al., 2008; AYHAN et al., 2011). *DISC1* wurde erstmals bei den Mitgliedern einer großen schottischen Familie entdeckt, bei denen durch eine balancierte Translokation zwischen den Chromosomen 1 und 11 (1;11)(q42.1; q14.3), d. h. durch die Verlagerung von Abschnitten des Chromosoms 1 auf Chromosom 11 und vice versa, die beiden Gene *DISC1* und *DISC2* auseinander gebrochen waren (PLETNIKOV et al., 2008; LAZAR et al., 2011) und diese Mutation wiederum mit der Erkrankung an Schizophrenie, Depression wie auch einer bipolaren Störung einherging (ABAZYAN et al., 2010; LAZAR et al., 2011). Von *DISC2* wird angenommen, dass es sich lediglich um ein regulatorisches Gen handelt, das kein Protein kodiert (MILLAR et al., 2000). *DISC1* wird im Gehirn u. a. im DG, Kortex, Bulbus olfactorius und in der Amygdala exprimiert (PLETNIKOV et al., 2008) und interagiert mit zahlreichen Proteinen, die für das Auswachsen der Neuriten sowie die neuronale Migration, z. B. der

Körnerzellen des DG, essentiell sind (LAZAR et al., 2011). Demzufolge spielt *DISC1* u. a. in der hippokampalen Entwicklung eine entscheidende Rolle (RAPOPORT et al., 2005). Man geht davon aus, dass die Translokation entweder zur Haploinsuffizienz des *DISC1*-Gens oder zur Entstehung eines mutierten bzw. verkürzten Proteinprodukts, welches dominant-negativ reagiert, führt, wobei beide Ergebnisse Störungen der Proteinkomplexe zwischen Disc1 und seinen Interaktionspartnern sowie einen Funktionsverlust von Disc1 hervorrufen (ABAZYAN et al., 2010). Daraus folgen eine anomale neuronale Migration sowie Reduktionen der dendritischen Komplexität und des Neuritenwachstums, was an die *post mortem*-Befunde von Schizophrenie-Patienten erinnert (PLETNIKOV et al., 2008).

Um die zuvor erläuterten Schizophrenie-typischen Alterationen in einem präklinischen Tiermodell zu generieren, verwendeten PLETNIKOV und Kollegen (2008) das sogenannte Tet off-System, mit dessen Hilfe die Expression des mutierten humanen *DISC1*-Gens (*mhDISC1*) in genetisch veränderten Mäusen exogen und reversibel induziert werden kann. Das Tet-off-Expressionssystem, das schematisch in Abbildung 4 dargestellt ist, besteht aus zwei Plasmiden, nämlich dem Regulator- und dem Responder-Plasmid. Das von PLETNIKOV et al. (2008) erzeugte Responder-Plasmid dient zur Herstellung einzeltransgener *mhDISC1*-Mäuse, welche das mutierte *hDISC1*-Gen unter der Kontrolle eines Tetrazyklin-Responsiv-Elements (TRE) exprimieren. Dabei ist anzumerken, dass die TRE-Sequenz einem Cytomegalovirus-Minimalpromoter (P_{\min} CMV) vorgelagert ist, sich also „upstream“ zu diesem befindet. Das Regulator-Plasmid, welches in eine zweite Mauslinie eingebracht wurde (PLETNIKOV et al., 2008), setzt sich aus dem Tetrazyklin-abhängigen Transaktivator (tTA) und dem vorgeschalteten Promoter der Calcium-Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II- α (CaMKII) zusammen. Durch die Verwendung dieses Promoters wird letztlich eine auf das Vorderhirn beschränkte Expression des mutierten *hDISC1* erreicht, da die CaMKII zwar in vielen Geweben, aber speziell im Vorderhirn exprimiert wird. In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, dass der Transaktivator selbst wiederum aus zwei Komponenten aufgebaut ist. Und zwar handelt es hierbei um eine Fusion des von *Escherichia coli* abstammenden Tet-Repressors (TetR) mit der vom Herpes simplex-Virus abgeleiteten Aktivierungsdomäne VP16. Durch die Verpaarung beider einzeltransgener Mauslinien wurden bitransgene Tiere generiert (PLETNIKOV et al., 2008), die das mutierte *hDISC1* dann exprimieren, wenn tTA in Abwesenheit (daher Tet-off) des Antibiotikums Tetrazyklin bzw. dessen Analogons Doxyzyklin (Dox) an seine Konsensussequenz TRE bindet und damit den CMV-Promoter bzw. die durch diesen gesteuerte Transkription des *mhDISC1*-Gens aktiviert. Durch

Zusatz Doxzyklin-haltiger Futterpellets wird die Expression von *mhDISC1* in den doppeltransgenen Mäusen supprimiert, da sich das Antibiotikum an den Transaktivator anlagert, dadurch eine Konformationsänderung des Komplexes verursacht und somit letztlich die Anlagerung an TRE inhibiert. Um die Expression des mutierten *hDisc1*-Proteins zuverlässig im Gewebe detektieren zu können, fusionierten PLETNIKOV und Kollegen (2008) das Gen am N-Terminus mit einem Polypeptid-Tag (Myc-Tag; engl. tag = Markierung, Kennzeichnung), wodurch sich das fusionierte Proteinprodukt unter Einsatz eines spezifischen anti-Myc-Antikörpers nachweisen lässt.

Abb. 4: Schematische Darstellung des Tet-off-Systems zur Herstellung bitransgener CaMKII-tTA x tet-h*DISC1*-Mäuse



Die Abbildung zeigt schematisch den Aufbau des Regulator- und Responderplasmids des im vorherigen Text erläuterten Tet-off-Expressionssystems, welches von PLETNIKOV et al. (2008) für die Generierung der bitransgenen CaMKII-tTA x tet-h*DISC1*-Mäuse verwendet wurde. Durch Zugabe des Antibiotikums Doxzyklin zum Futter der Tiere kann die Transkription des mutierten humanen *DISC1*-Gens, welche aufgrund der Verwendung des spezifischen CaMKII-Promoters primär auf das Vorderhirn beschränkt ist, gezielt supprimiert werden. CaMKII: Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II- α ; tetR: Tet-Repressor (*Escherichia coli*); VP16: Virusprotein 16 = Aktivierungsdomäne (Herpes simplex); tTA: Tetrazyklin-abhängigen Transaktivator; Dox: Doxzyklin; TRE: Tetrazyklin-Responsiv-Element; P_{min} CMV: Cytomegalovirus-Minimalpromoter; h*DISC1*: mutiertes humanes *DISC1*-Gen.

Anhand von Verhaltenstests ließ sich beobachten, dass die bitransgenen Tiere u. a. Beeinträchtigungen in der Präpulsinhibition sowie im Arbeits- und Raumgedächtnis, aber auch in der sozialen Interaktion zeigten und sich darüber hinaus hyperaktiv verhielten (PLETNIKOV et al., 2008; LAZAR et al., 2011), wodurch nicht nur kognitive Defizite, sondern auch negative bzw. positive Symptome der Schizophrenie auf genetischer Basis im Tiermodell induziert wurden. Diese Verhaltensanomalien waren zudem mit einem verminderten Neuritenwachstum und einer leichten Vergrößerung der lateralen

Hirnventrikel verbunden (PLETNIKOV et al., 2008). Auch in Bezug auf die kortikalen und hippocampalen PV⁺ Interneuronpopulationen wurden für die transgenen *hDISC1*-Mäuse Verluste nachgewiesen (SHEN et al., 2008; AYHAN et al., 2011). Die in der Literatur beschriebenen Effekte auf die Spinedichte der Körnerzeldendriten des DG sind jedoch inhomogen. So stellten AYHAN et al. (2011) eine signifikante Zunahme der Spinedichte dieser hippocampalen Granularzellen fest, während ABAZYAN und Kollegen (2010) diesbezüglich keine Veränderungen detektieren konnten. Generell erscheint das präklinische *hDISC1*-Modell als sehr wertvoll für die Erforschung pathogener Mechanismen der Schizophrenie sowie verwandter psychiatrischer Erkrankungen (PLETNIKOV et al., 2008).

2.3 Exkurs zu Morbus Alzheimer

Die bereits existierenden Resultate der Spine-Analyse Golgi-markierter Schnitte eines murinen Modells des Morbus Alzheimer dienten als Referenz für die Etablierung der Gene Gun-basierten automatischen Spine-Evaluation. Somit lag der Fokus hierbei auf der Optimierung der Gene Gun-Technik wie auch der Entwicklung entsprechender Algorithmen für die automatisierte Spine-Quantifizierung und -Klassifizierung. Aus diesem Grund sollen sowohl das verwendete Tiermodell des Morbus Alzheimer als auch die humane Erkrankung im Folgenden lediglich angesprochen, keineswegs aber detailliert erläutert werden.

2.3.1 Morbus Alzheimer - Ein allgemeiner Überblick

Der Morbus Alzheimer (AD, engl. Alzheimer's disease) ist eine altersabhängige neurodegenerative Erkrankung und betrifft als häufigste Form der Demenzerkrankungen etwa 20 % aller über 80-jährigen (KRAMS et al., 2010). Ca. 90 % der Erkrankungen an AD treten sporadisch auf, die verbleibenden 10 % sind familiären Ursprungs und mit Mutationen assoziiert, die insbesondere die Gene betreffen, die für Präsenilin-1 und -2 (auf Chromosom 14 bzw. 1) sowie für das Amyloid-Vorläuferprotein (APP, engl. amyloid precursor protein; auf Chromosom 21) kodieren (KRAMS et al., 2010; KURZ, 2013). Darüber hinaus stellt auch das homozygote Vorliegen des $\epsilon 4$ -Allels des Apolipoproteins E einen genetischen Risikofaktor dar, welcher das Auftreten der Krankheit begünstigt (KRAMS et al., 2010).

Charakterisiert wird AD durch einen progressiven kognitiven Verfall sowie strukturelle Alterationen primär der Hirnregionen, die für Denken, Lernen, Sprache, Gedächtnis, Emotionalität und Orientierungsfähigkeit zuständig sind (SMITH et al., 2009; KURZ, 2013). Demnach sind v. a. Kortex, Hippokampus, basales Vorderhirn (Nukleus basalis Meynert) sowie Amygdala durch Defizite in Form von Degenerationen der dort lokalisierten Synapsen und Neurone gekennzeichnet, die letztlich zur Schrumpfung dieser Gehirnareale führen (MATTSON, 2004; SMITH et al., 2009). Der Verlauf der Alzheimer-Krankheit, der in die drei Stadien leichtgradige, mittelschwere und schwere Demenz unterteilt wird (KURZ, 2013), ist durch eine progrediente Verschlechterung sämtlicher geistiger Fähigkeiten und des Gedächtnisses bis hin zu drastischen Persönlichkeitsveränderungen (MATTSON, 2004), dem Versiegen der Sprache und der völligen Pflegebedürftigkeit gekennzeichnet (KURZ, 2013).

Den Schädigungen liegen zwei wesentliche pathologische Befunde zugrunde: die extrazelluläre Ablagerung Amyloid- β -Peptid-haltiger (A β -) Plaques und die intrazelluläre Ansammlung von Neurofibrillenbündeln, die aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein bestehen (z. B. SMITH et al., 2009; KRAMS et al., 2010; KURZ, 2013). Das schwer lösliche Amyloid- β -Peptid geht aus einer fehlerhaften proteolytischen Prozessierung des APP hervor, welche durch Präsenilin-1 und -2 reguliert (SMITH et al., 2009) und von den Enzymen β - und γ -Sekretase ausgeführt wird (ALPÁR et al., 2006). Beim Tau-Protein handelt es sich um ein Zytoskelett-Protein, das unter physiologischen Bedingungen enzymatisch dephosphoryliert wird. Bei AD ist jedoch das Gegenteil der Fall, nämlich die Hyperphosphorylierung des Proteins, wodurch es zu Faserknäueln (Neurofibrillenbündel) verklebt und sich in den Nervenzellen ablagert (KRAMS et al., 2010; KURZ, 2013). In Bezug auf die Neurotransmission sind in erster Linie Acetylcholin und Glutamat von pathologischen Veränderungen gekennzeichnet und korrelieren mit den Defiziten in Aufmerksamkeit, Lernen und Gedächtnis (MARAGOS et al., 1987; PERRY, 1988; MATTSON, 2004; KURZ, 2013). Während ein deutlicher Mangel an Acetylcholin aufgrund der Degeneration der Neurone des Nukleus basalis Meynert vorliegt (PERRY, 1988), kommt es in Folge einer glutamatergen Hyperstimulation zur Exzitotoxizität, d. h. zur neuronalen Überlastung mit Calcium, und schließlich zum Absterben kortikaler und hippokampaler Pyramidenzellen (MARAGOS et al., 1987; REISBERG et al., 2003). Darüber hinaus wird auch eine Beteiligung des serotonergen und des noradrenergen Transmittersystem an der AD-Symptomatik angenommen (MARAGOS et al., 1987).

Bei den vorhandenen therapeutischen Interventionen handelt es sich ausschließlich um symptomatische Behandlungsmöglichkeiten, die das Fortschreiten der Symptome hinauszögern (KURZ, 2013). Neben den sogenannten Antidementiva, welche die acetylcholinerge bzw. glutamaterge Transmission verbessern, werden teilweise auch Antipsychotika und Antidepressiva eingesetzt, um die auftretenden Verhaltensanomalien, z. B. Aggressivität, depressive Verstimmung, zu behandeln. Darüber hinaus leistet jedoch auch die nicht-medikamentöse Behandlung in Form von u. a. Physio- und Ergotherapie, Logopädie sowie kognitivem Training einen entscheidenden Beitrag zur Verbesserung der Fähigkeiten und der Erhöhung der Lebensqualität des Alzheimer-Patienten (KURZ, 2013).

2.3.2 Das präklinische APPSWE-Mausmodell des Morbus Alzheimer

Beim APPSWE-Modell des Morbus Alzheimer handelt es sich um transgene (Tg) Mäuse, die von KAREN HSIAO und Kollegen an der Universität von Minnesota, USA entwickelt wurden und allgemein als Tg2576-Stamm bekannt sind (HSIAO et al., 1996). In den APPSWE-Mäusen kommt es zur Überexpression einer mutierten Isoform des humanen APP, die aus 695 Aminosäuren besteht (APP₆₉₅) und die Schwedische Doppelmutation (SWE) enthält (HSIAO et al., 1996). Diese Zweifach-Mutation, die erstmals in einer großen schwedischen Familie gefunden wurde und einen frühen familiären Beginn des Morbus Alzheimer auslöst, bezieht sich zum einen auf die Position 670 der APP-Aminosäure-Sequenz, an der Lysin durch Asparagin ersetzt wird, zum anderen auf die Position 671, an der Methionin durch Leucin substituiert wird (HSIAO et al., 1996). Die APPSWE-Mutation geht mit erhöhten Konzentrationen zweier Varianten des A β -Peptids, A β 40 und A β 42, einher (KAWARABAYASHI et al., 2001), die letztlich aus der γ -Sekretase-vermittelten proteolytischen Spaltung des APP hervorgehen und sich in der Länge ihrer Aminosäurereste unterscheiden (40 bzw 42 Aminosäuren). Für die längere Isoform A β 42 wurde anhand von *in vitro*-Untersuchungen gezeigt, dass sie schneller Fibrillen (Fäserchen) bildet als A β 40 und den Hauptbestandteil der AD-Plaques darstellt (KAWARABAYASHI et al., 2001). In den Tg2576-Mäusen treten diese A β -haltigen Plaques, die denen der humanen Erkrankung entsprechen (HSIAO et al., 1996; KAWARABAYASHI et al., 2001) vielzählig sowohl in kortikalen (frontal, temporal, entorhinal) als auch in limbischen Gehirnregionen (Hippokampus, Subiculum) auf (HSIAO et al., 1996). Die transgenen APPSWE-Mäuse repräsentieren somit ein präklinisches AD-Modell, das die Verhaltensänderungen und pathologischen Charakteristika der humanen Erkrankung robust simuliert (HSIAO et al., 1996) und folglich der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen A β und den kognitiven Defiziten, z. B. dem Gedächtnisverlust dient (WESTERMAN et al., 2002).

Die Expression des humanen APP wird von einem Prion-Protein-Promoter gesteuert, der eine spezifische Transgen-Expression im Gehirn induziert (KAWARABAYASHI et al., 2001). Zwar konnten KAWARABAYASHI und Kollegen (2001) hohe APP-Expressionslevel im Gehirn auch bestätigen, dennoch beobachteten sie zusätzlich hohe APP-Vorkommen in Milz und Lunge sowie moderate Level in weiteren Geweben (z. B. Herz, Haut) der Tg2576-Mäuse. Während die transgenen Tiere im Alter von drei Monaten ein normales Lernverhalten und Gedächtnis zeigen, treten im Alter ab neun Monaten diesbezüglich deutliche Beeinträchtigungen auf, die von einem 5-fachen Anstieg des A β 40, einer 14-fachen

Erhöhung des A β 42 sowie der Ablagerung zahlreicher Amyloid-Plaques begleitet werden (HSIAO et al., 1996). Sowohl KAWARABAYASHI et al. (2001) als auch WESTERMAN et al. (2002) stellten allerdings fest, dass es in den Tg2576-Mäusen ab einem Alter von sechs Monaten zu Veränderungen der A β -Peptide kommt. Während bis zu diesem Alter nur lösliche Peptide in den Tieren vorliegen, treten ab diesem Zeitpunkt unlösliche A β 42- und A β 40-Aggregate in Erscheinung, deren Vorkommen bis zum einem Alter von zehn Monaten exponentiell ansteigt (KAWARABAYASHI et al., 2001). Es wird jedoch angenommen, dass nicht primär die unlöslichen Peptid-Aggregationen die kognitiven Defizite induzieren, sondern vielmehr kleine lösliche A β -Oligomere (WESTERMAN et al., 2002), die sich folglich bereits vor dem Auftreten der Plaques bilden und synaptische Alterationen hervorrufen (PEREZ-CRUZ et al., 2011).

Bereits in einem Alter von 5,5 Monaten wiesen PEREZ-CRUZ et al. (2011) eine 34%ige Reduktion der Mushroom-Spines auf den proximalen Segmenten der basalen Pyramidenzellendriten in CA1 für Tg2576-Mäuse im Vergleich zu Kontrolltieren nach. Da die transgenen Tiere in diesem Alter noch keine extrazellulären Plaques, aber hohe Konzentrationen der zuvor genannten A β -Oligomere aufweisen, wird davon ausgegangen, dass dem Synapsen-Verlust zu diesem frühen Zeitpunkt der Pathogenese ein Mechanismus zugrunde liegt, der von den löslichen A β -Oligomeren vermittelt wird (PEREZ-CRUZ et al., 2011). Aufgrund der selektiven Degeneration der proximalen Synapsen basaler Dendriten wird vermutet, dass dieses Defizit dem Untergang GABAerger Interneuronafferenzen zuzuschreiben ist, aus dem eine lokale glutamaterge Exzitotoxizität im Stratum oriens resultiert (PEREZ-CRUZ et al., 2011). Ein ebenfalls spezifischer Effekt wurde für die apikalen Dendritenbäume der Pyramidenneurone des primären somatosensorischen Kortex (Laminae II und III) in 11 Monate alten Tg2576-Mäusen detektiert (ALPÁR et al., 2006). Einerseits war die Gesamtlänge der apikalen Dendriten kürzer, was mit der geringeren Anzahl dendritischer Verzweigungspunkte und der damit assoziierten verminderten Dendritendichte zusammenhing. Andererseits waren apikale dendritische Segmente jenseits der 5. hierarchischen Ordnung nicht nachweisbar (ALPÁR et al., 2006). Darüber hinaus wurde ein Verlust dendritischer Spines auf den gesamten apikalen Dendriten gezeigt, wobei dieser auf den mittleren und distalen Dendritenabschnitten besonders stark ausgeprägt war (ALPÁR et al., 2006). Als Ursache der Spine-Defizite ist es zum einen denkbar, dass das überexprimierte mutierte humane APP gewissermaßen dem endogenen murinen APP entgegenwirkt und dadurch die

korrekte Synapsenformation behindert wird. Zum anderen wird auch hier die drastisch erhöhte A β -Konzentration als Begründung angeführt (ALPÁR et al., 2006).

Da mit fortschreitendem Alter der APPSWE-Mäuse (12 - 23 Monate) die neuritischen A β -haltigen Plaques sowie die biochemisch extrahierbaren A β 42- und A β 40-Peptide Konzentrationen erreichen, die denen von AD-Patienten entsprechen (KAWARABAYASHI et al., 2001), untersuchten SPIRES und Kollegen (2005) die Effekte kortikaler Plaques auf die synaptischen Dornfortsätze in 21 - 24 Monate alten Tg2576-Mäusen. Dabei fanden die Forscher nicht nur eine generelle Abnahme der kortikalen Spinedichte in Höhe von etwa 27 % im Vergleich zu nicht-transgenen Kontrollen, sondern auch einen ca. 54%igen Spine-Verlust auf den Dendriten, die sich in einem Bereich von 15 μ m um den Plaque herum erstreckten (SPIRES et al., 2005). Trotz der ausgeprägten Degeneration, die auf eine fokale Toxizität der Amyloid-Ablagerungen zurückgeführt wurde, lagen hinsichtlich der verbliebenen kortikalen Spines keine morphologischen Veränderungen vor (SPIRES et al., 2005).

2.4 Synaptische Dornfortsätze

2.4.1 Aufbau und Morphologie synaptischer Dornfortsätze

Die synaptischen Dornfortsätze, auch als dendritische Dornen (engl. dendritic spines) oder Spines bezeichnet, sind postsynaptische Mikrokompimente, die sich als kleine Vorsprünge aus den Membranen neuronaler Dendriten vorwölben (HERING & SHENG, 2001; TACKENBERG et al., 2009). Während die meisten der Glutamat- bzw. GABA-ausschüttenden Projektionsneurone, z. B. Pyramiden- bzw. Purkinjezellen, dendritische Spines besitzen, gibt es durchaus auch spinelose Nervenzellen, wie die meisten GABAergen Interneurone (HERING & SHENG, 2001). Ein vollentwickelter Dendrit besitzt 1-10 Spines je μ m Länge (SORRA & HARRIS, 2000; HERING & SHENG, 2001) und etwa 90 % aller exzitatorischen Synapsen des ausgereiften Säuger-Hirns enden auf den dendritischen Spines, d. h. der erregende Eingang (Input) trifft primär hier ein (HARRIS & KATER, 1994; TACKENBERG et al., 2009). Die Dornfortsätze sind sehr heterogen in Größe und Morphologie (SORRA & HARRIS, 2000; HERING & SHENG, 2001), bestehen aber typischerweise aus einem „Kopf“ und einem „Hals“, über den sie mit dem Dendrit verbunden sind (TACKENBERG et al., 2009). In der Regel beherbergt dabei ein Spine-Kopf jeweils eine Synapse (HARRIS & KATER, 1994). An der Kontaktstelle zwischen

präsynaptischem Axon und dendritischem Spine, d. h. am Ende oder seitlich des Spine-Kopfes, enthält jeder Dornfortsatz eine sogenannte postsynaptische Membranverdickung, die sich aus Rezeptoren, u. a. glutamaterge AMPA- und NMDA-Rezeptoren, Ionenkanälen, Gerüstproteinen sowie Signalmolekülen zusammensetzt. Einige Dornfortsätze enthalten außerdem glattes endoplasmatisches Retikulum (engl. smooth endoplasmic reticulum, SER), das für die Regulation der Calcium-Konzentration verantwortlich ist. Ist das SER in Stapeln angeordnet, wird es als Spine-Apparat bezeichnet. Weiterhin kommen in den Spines häufig Polyribosomen vor, von denen angenommen wird, dass sie der lokalen Proteinsynthese dienen. Während Mikrotubuli und Intermediärfilamente im Allgemeinen nicht in synaptischen Dornfortsätzen vorkommen, ist das Zytoskelett aus Aktinfilamenten aufgebaut (SORRA & HARRIS, 2000; ZITO & MURTHY, 2002).

Trotz der strukturellen Heterogenität der Dornfortsätze, welche sich nicht nur auf unterschiedliche Zelltypen, sondern auch auf direkt benachbarte Spines eines einzelnen Dendriten bezieht (HERING & SHENG, 2001; HARRIS & KATER, 1994), können verschiedene Spine-Klassen differenziert werden (z. B. SORRA & HARRIS, 2000; HERING & SHENG, 2001; TACKENBERG et al., 2009). Die vier wichtigsten morphologischen Subtypen, die für die vorliegende Arbeit von Bedeutung waren, sind unten in Abbildung 5 skizziert und lauten (SORRA & HARRIS, 2000; TACKENBERG et al., 2009):

1. Mushroom-Spines. Diese Klasse zeichnet sich durch einen großen Kopf knollig-rundlicher oder unregelmäßiger Form mit einem Durchmesser von i. d. R. mehr als 0,6 μm sowie einen meist schmalen Hals aus und kann eine Gesamtlänge von bis zu 3 μm erreichen. Das Verhältnis zwischen Kopf und Hals ist größer als 1.

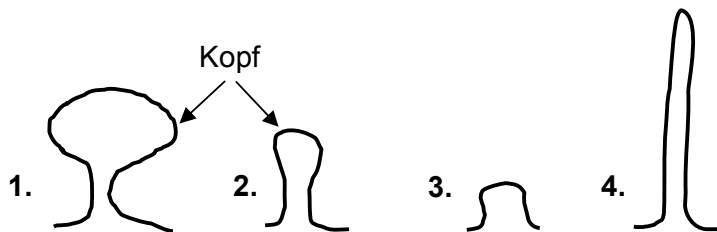
2. Thin-Spines. Diese Spines besitzen ebenfalls einen Kopf, jedoch ist dieser mit einem Durchmesser von weniger als 0,6 μm wesentlich kleiner als bei den Mushrooms. Ihre Gesamtlänge, die 1 μm nicht übersteigt, ist größer als der Durchmesser des im Vergleich zu den Mushrooms kürzeren Halses. Das Verhältnis zwischen Kopf und Hals entspricht etwa 1.

3. Stubby-Spines. Dieser Subtyp ist halslos, wodurch auch kein direkter Kopf erkennbar ist. Aufgrund ihrer stummelförmigen Gestalt und ihrer geringen Länge von etwa 0,5 μm oder weniger erscheinen sie als „kleine Hügel“ auf dem Dendrit.

4. Filopodia-Spines. Bei den Filopodia handelt es sich nicht um eine „echte“ Spine-Klasse, sondern vielmehr um einen fingerförmigen Vorläufertyp (s. u.) ohne Kopf, dessen

Gesamtlänge mit mehr als 3 μm (bis zu 10 μm) den Durchmesser des langen, schmalen Halses deutlich übersteigt.

Abb. 5: Skizzen der Morphologie der vier analysierten Spine-Klassen



Die Skizzen veranschaulichen die Morphologie der Mushroom- (1.), Thin- (2.), Stubby- (3.) und Filopodia-Spines (4.). Während die Mushroom- und Thin-Spines (1. + 2.) aus Kopf und Hals bestehen, handelt es sich bei den Stubby- und Filopodia-Spines (3. + 4.) um kopflose Subtypen.

In diesem Zusammenhang ist es allerdings wichtig zu wissen, dass es sich bei den Spines nicht um stabile, sondern um dynamische Strukturen handelt. Auf der einen Seite können innerhalb von Sekunden kleine morphologische Modifikationen auftreten, auf der anderen Seite sind innerhalb von Minuten bis Stunden erhebliche Gestaltänderungen bis hin zum völligen Verschwinden bzw. der Neubildung von Spines möglich (BONHOEFFER & YUSTE, 2002; ZITO & MURTHY, 2002). Es wird angenommen, dass mit der morphologischen Veränderung, welche über eine Remodellierung des spineinternen Aktin-Zytoskeletts vermittelt wird (HERING & SHENG, 2001; BONHOEFFER & YUSTE, 2002), zudem ein spezifischer Lebenszyklus der Spines assoziiert ist (HERING & SHENG, 2001; TACKENBERG et al., 2009). Demzufolge werden die Filopodia als Spine-Vorläufer angesehen, die sich aus der dendritischen Membran hervorstrecken und über die Ausbildung einer Präsynapse den Kontakt zu benachbarten Axonen herstellen. Anschließend ziehen sich die Filopodia wieder zurück und wandeln sich im Zuge der Stabilisierung der Synapse in einen Stubby-Spine um. Aus diesem geht nachfolgend ein reifer Mushroom- oder Thin-Spine hervor, womit die Synapse ebenfalls ihre vollständige Stabilität erhält (SORRA & HARRIS, 2000; POLLEUX & GHOSH, 2008). Demnach gehen morphologische Veränderungen der synaptischen Dornfortsätze mit der Entwicklung dieser einher und sind zugleich mit der Synaptogenese verbunden (HARRIS & KATER, 1994; POLLEUX & GHOSH, 2008). Somit kommen die kurzlebigen Filopodia v. a. in der frühen postnatalen Phase besonders zahlreich vor, während die im Vergleich dazu stabileren Thin- und Mushroom-Spines im adulten Gehirn dominieren (HERING & SHENG, 2001). Die Spine-Entwicklung und daraus resultierend die Spine-Dichte sind allerdings auch aktivitätsabhängig und werden durch

sensorische Erfahrungen sowie Umgebungsfaktoren beeinflusst (HERING & SHENG, 2001; POLLEUX & GHOSH, 2008). Das bedeutet, dass die Spine-Dichte beispielsweise in Zusammenhang mit Lernen und Erinnern sowie visueller Stimulation steigt, während Erkrankungen des Nervensystems sie vermindern können (HARRIS & KATER, 1994; HERING & SHENG, 2001). Dementsprechend liegt die morphologische Motilität der Spines nicht nur ihrer Neubildung während der Entwicklung (Synaptogenese) zugrunde, sondern auch der synaptischen Plastizität, welche auf Veränderungen bereits existierender Spines basiert (CARTER & SABATINI, 2008).

2.4.2 Funktion synaptischer Dornfortsätze

Auch wenn die Funktion der synaptischen Dornfortsätze noch nicht vollständig aufgeklärt ist, geht man davon aus, dass sie neben dem Empfang des exzitatorischen Inputs (s. o.) die synaptische Dichte erhöhen, indem sie es den Dendriten aufgrund ihrer Vorwölbung ermöglichen, auch mit etwas weiter entfernt gelegenen Axonen Synapsen auszubilden (SORRA & HARRIS, 2000; ZITO & MURTHY, 2002). Dadurch, dass die Spines durch ihren Hals gewissermaßen vom Dendrit separiert sind, bilden sie semi-autonome Mikrokompimente, die zum einen der Segregation postsynaptischer Antworten und in dem Zusammenhang der Calcium-Regulation dienen und zum anderen die Spezifität der Synapsen gewährleisten (HERING & SHENG, 2001; BONHOEFFER & YUSTE, 2002; ZITO & MURTHY, 2002). Aufgrund der Kompartimentierung wird die Ausbreitung spineinterner Veränderungen der Calcium-Konzentration, die aus einer Aktivierung der jeweiligen Synapse resultieren, auf benachbarte inaktive Synapsen unterbunden und damit die spezifische Plastizität der Spines und Synapsen gesichert (SORRA & HARRIS, 2000). Darüber hinaus ist es denkbar, dass die Dornfortsätze aufgrund dieser „Calcium-Isolation“ das Neuron vor Exzitotoxizität schützen und sich, wenn ihre interne Kapazität der Calcium-Pufferung (z. B. mittels SER) ausgeschöpft ist, schlimmstenfalls zurückziehen, so dass der Spine und damit die synaptische Funktion verloren gehen (SORRA & HARRIS, 2000).

In Abhängigkeit von der Calcium-Regulation erfolgt die Regulierung der Phosphorylierung postsynaptischer Proteine, welche wiederum für die synaptische Plastizität nötig ist (TACKENBERG et al., 2009). In diesem Zusammenhang wird vermutet, dass die differente Morphologie der Spines unterschiedliche Effekte auf die Calcium-Kinetik ausübt (SORRA & HARRIS, 2000). Da die Diffusionsdauer von der Länge des Spine-Halses bestimmt wird, läuft zum einen die Calcium-induzierte postsynaptische Signalkaskade in Spines mit

längeren Hälsen langsamer ab als in kurzhalsigen Spines, zum anderen bleibt die Calcium-Kompartimentierung bzw. -„Isolation“ in langhalsigen Spines länger bestehen (HERING & SHENG, 2001; BONHOEFFER & YUSTE, 2002). Wie oben erwähnt, ist auch das SER, das eher in großen als in kleinen Spines vorkommt, an der Regulation der Calcium-Homöostase beteiligt, womit die Hypothese unterschiedlicher Abläufe in Mushroom- und Thin-Spines unterstrichen wird (TACKENBERG et al., 2009). Zudem wurden in der postsynaptischen Verdickung von Mushroom-Spines mehr AMPA-Rezeptoren festgestellt, wodurch die Synapse funktionell stärker ist, während Thin-Spines in erster Linie NMDA-Rezeptoren enthalten. Daraus wurde einerseits gefolgert, dass Mushroom-Spines stabiler und daher für die Formung des Gedächtnisses verantwortlich sind, andererseits, dass die Thin-Spines flexibler und somit für Lernvorgänge essentiell sind (TACKENBERG et al., 2009). Im Zusammenhang mit Lernen und Gedächtnis sollen auch die Langzeit-Potenzierung und -Depression erwähnt werden, d. h. die lang anhaltende Verstärkung bzw. Abschwächung der synaptischen Transmission. Beide Prozesse sind von Erfahrungen abhängig und gehen mit morphologischen Veränderungen der Dornfortsätze einher. So kommt es im Fall der Potenzierung u. a. zu einer Vergrößerung und Stabilisierung der Spines (MATSUZAKI, 2007) sowie zur Verkürzung des Spine-Halses und zur Zunahme der synaptischen Fläche (HERING & SHENG, 2001). Entgegengesetzt dazu bewirkt die Langzeit-Depression eine Schrumpfung und Eliminierung von Spines (MATSUZAKI, 2007).

2.4.3 Pathologische Alterationen der synaptischen Dornfortsätze bei Schizophrenie

Post mortem-Untersuchungen ergaben diverse Alterationen bezüglich der Quantität synaptischer Dornfortsätze in den Gehirnen von Schizophrenie-Patienten. So stellten SWEET et al. (2009) hinsichtlich der Pyramidenzellen der tiefen Lamina III des primären sowie assoziativen auditorischen Kortex reduzierte Spinezahlen fest, wobei das nachgewiesene Defizit interessanterweise in Patienten, die Suizid begangen hatten, größer war als in krankheitsbedingt verstorbenen Patienten. Wie im Kontext des Spine-Aufbaus beschrieben (s. Abschnitt 2.4.1), sind auf den Spine-Köpfen glutamaterge NMDA-Rezeptoren lokalisiert, weshalb die verminderte Spine-Dichte auf eine geringere Rezeptor-Aktivierung sowie einen verringerten exzitatorischen Input im auditorischen Kortex schließen lässt, woraus wiederum die Schizophrenie-typischen Beeinträchtigungen in der Verarbeitung auditiver Reize sowie die akustischen Halluzinationen resultieren können (BARTA et al., 1990; SWEET et al., 2009).

Neben dem Verlust primärer und sekundärer basaler Pyramidenzell-Dendriten der Schichten III und V des mPFC und dem damit assoziierten Defizit der synaptischen Fläche (BROADBELT et al., 2002) wurden auch weitere Reduktionen der Spine-Dichte für die Pyramidenzellen der Lamina III des präfrontalen und des temporalen Kortex publiziert (GAREY et al., 1998). Zudem beobachteten GAREY und Kollegen (1998) anomale exzitatorische Synapsen, welche durch ungewöhnlich kleine postsynaptische Verdickungen sowie durch weit von diesen entfernt auffindbare verklumpte Vesikel charakterisiert waren. Aufgrund der zuvor genannten Lokalisation der NMDA-Rezeptoren lässt sich daraus ein Zusammenhang zwischen dem Spine-Defizit und der Glutamat-Hypothese (Hypofunktion des Glutamat-Systems) der Schizophrenie (vgl. Abschnitt 2.1.8) folgern (GAREY et al., 1998). Da die Spines zuvor genannter Nervenzellen neben glutamatergen auch dopaminerge Synapsen ausbilden, erscheint es außerdem plausibel, dass das Spine-Defizit zumindest einen Teilbeitrag zur verminderten dopaminergen Innervation des Kortex leistet (Hypofunktion des mesokortikalen DA-Systems, vgl. Abschnitt 2.1.8) (GAREY et al., 1998). Weiterhin liegt die Vermutung nahe, dass aufgrund der vielfältigen kortiko-kortikalen Projektionen der temporalen und frontalen Lamina III-Pyramidenneurone ihr Spine-Verlust mit den Schizophrenie-typischen kognitiven Beeinträchtigungen assoziiert ist (GAREY et al., 1998). GLANTZ & LEWIS (2000) fanden nicht nur reduzierte Spinezahlen auf den basalen Pyramidenzell-Dendriten der tiefen Lamina III des DLFC, sondern auch eine geringere dendritische Gesamtlänge dieser Neurone sowie eine tendenziell geminderte Spine-Dichte der Neurone der oberflächlichen Lamina III. Auch von der eingeschränkten synaptischen Konnektivität dieser Kortextbereiche wird angenommen, dass sie zu den kognitiven Defiziten von Schizophrenie-Patienten beiträgt (GLANTZ & LEWIS, 2000).

Des Weiteren ist der Literatur nicht nur eine ebenfalls dezimierte Spinezahl bezüglich der apikalen Dendriten des hippocampalen Subiculus zu entnehmen, sondern auch eine geringere Ausprägung der apikalen Dendritenbäume in dieser Region (ROSOKLIJA et al., 2000). ROBERTS et al. (1996) wiesen außerdem eine geringere Größe der synaptischen Dornfortsätze des Striatums nach. Aufgrund des glutamatergen kortikalen Inputs auf den Köpfen und des dopaminergen nigralen Inputs auf den Halsen der striatalen Spines wurde eine Verbindung zu den für eine Schizophrenie charakteristischen Veränderungen dieser beiden Transmittersysteme postuliert (ROBERTS et al., 1996).

Auch wenn die Ursache des Untergangs der Dornfortsätze noch nicht aufgeklärt ist, wird dieser v. a. mit gestörten bzw. übermäßigen Pruningvorgängen während der

Gehirnentwicklung in Verbindung gebracht (GAREY et al., 1998). Darüber hinaus können sowohl eine Veränderung des sozialen Umfelds, z. B. bedingt durch eine Hospitalisierung und dem damit verbundenen sensorischen Mangel (ROSOKLIJA et al., 2000), als auch der Missbrauch von Alkohol und/oder Drogen die Spine-Dichte in Schizophrenie-Patienten beeinflussen (GAREY et al., 1998).

2.4.4 Pathologische Alterationen der synaptischen Dornfortsätze bei Morbus Alzheimer

Die Gehirnnareale, in denen sich die für Alzheimer typischen Plaques primär ablagern, d. h. insbesondere entorhinaler Kortex, Hippokampus, basales Vorderhirn sowie Amygdala, weisen eine reduzierte Anzahl an Synapsen sowie beschädigte Neuriten auf (MATTSON, 2004). Jedoch wird angenommen, dass subtile Alterationen in Funktion und Struktur der Synapsen und Axone dieser Hirnregionen bereits zu Beginn der Pathogenese ablaufen und dass es mit dem Fortschreiten der synaptischen Degeneration zu einer kompensatorischen Vergrößerung der verbleibenden Synapsen kommt (DEKOSKY & SCHEFF, 1990; MATTSON, 2004). DEKOSKY & SCHEFF (1990) untersuchten sowohl Biopsie- als auch Autopsiegewebe des frontalen Kortex von AD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen und rekonstruierten damit die frühe bis mittlere Phase sowie das Endstadium der Alzheimer'schen Krankheit. Dabei stellten sie zum einen fest, dass das synaptische Defizit in Lamina III bereits in den lebenden Patienten, d. h. in der frühen bis mittleren Erkrankungsphase, ausgeprägt, jedoch *post mortem* noch größer ist. Da sich zum anderen bezüglich der kompensatorischen Erweiterung der synaptischen Kontaktfläche kein Unterschied zwischen Biopsie- und Autopsiematerial ergab, kann davon ausgegangen werden, dass die maximale kortikale Kompensationsfähigkeit spätestens im mittleren AD-Stadium erreicht und im Endstadium völlig erschöpft ist, so dass am Ende der Krankheit der Untergang von Synapsendichte und synaptischer Kontaktfläche dominieren (DEKOSKY & SCHEFF, 1990).

LIPPA und Kollegen (1992) wiesen auf der Basis von *post mortem*-Gewebe einen massiven Zellkörper-Verlust im entorhinalen Kortex von AD-Patienten in Zusammenhang mit einem Rückgang der Synapsen-Dichte in den äußeren zwei Dritteln der äußeren Molekularschicht des DG nach. Zwar tritt im Laufe des normalen Alterungsprozesses ebenfalls eine Reduktion der entorhinalen Perikarya auf, jedoch ist diese in AD-Patienten deutlich stärker ausgeprägt (LIPPA et al., 1992). Zudem kommt es während des physiologischen Alterns nicht zur Synapsen-Degeneration im DG, was o. g.

Kompensationsmechanismen auch innerhalb des Tractus perforans (Nervenfaserbahn vom entorhinalen Kortex zur äußeren Molekularschicht des DG) vermuten lässt, welche im Gegensatz dazu bei einer Erkrankung an AD dem beschleunigten Niedergang der Zellkörper nicht standhalten können (LIPPA et al., 1992). Eine andere mögliche Erklärung für den AD-spezifischen Synapsen-Verlust ist gemäß LIPPA et al. (1992), dass die Degeneration von Zellkörpern und Synapsen unabhängig voneinander stattfindet. Diese Hypothese wird auch von TERRY et al. (1991) sowie MASLIAH et al. (1991) vertreten, die hinsichtlich des Neokortex von AD-Patienten *post mortem* zeigten, dass die Degeneration präsynaptischer Endigungen größere Ausmaße annimmt als der Verlust der Perikarya und demnach dem Untergang neokortikaler Pyramidenzellen vorangeht. Generell zeigten die Forscher in AD- verglichen mit gesundem Gewebe einen 40%igen (TERRY et al., 1991) bzw. 45%igen (MASLIAH et al., 1991) Untergang der Synapsen in den frontalen, parietalen (TERRY et al., 1991) sowie temporalen (MASLIAH et al., 1991) Regionen des Neokortex. Bedingt durch dieses synaptische Defizit geht die interneuronale Kommunikation im Neokortex von AD-Patienten verloren, d. h. es kommt zu schwerwiegenden Störungen der kortikalen Konnektivität, welche mit den AD-typischen Beeinträchtigungen der Kognition verbunden sind (DEKOSKY & SCHEFF, 1990; TERRY et al., 1991). Daneben beobachteten MASLIAH und Kollegen (1991) im visuellen und entorhinalen Kortex wie auch im Hippokampus und Nukleus basalis Meynert den Verlust von Synapsen, wobei dieser fokal und somit geringer war als in den neokortikalen Bereichen. Im Gegensatz dazu detektierten SZE et al. (1997) mittels *post mortem*-Untersuchungen im Hippokampus von AD-Patienten eine 55%ige Synapsen-Degeneration im Vergleich zu gesunden Kontrollen, welche zudem sowohl mit den Beeinträchtigungen von Gedächtnis und Kognition korrelierte als auch in negativer Abhängigkeit zur Dichte der Aβ-Plaques stand. Dieser Zusammenhang zwischen mentaler Verfassung und Synapsenverlust wurde auch von DEKOSKY & SCHEFF (1990) auf der Basis von Biopsiematerial für den frontalen Kortex bestätigt. Wie bereits oben erwähnt (MATTSON, 2004) wird auch für die hippokampalen Defekte angenommen, dass sie sich bereits früh in der Pathogenese des Morbus Alzheimer ereignen und den neuropsychologischen Anzeichen kognitiver Defizite vorausgehen (SZE et al., 1997).

2.5 Methodische Einführung

2.5.1 Ballistische Fluoreszenzmarkierung einzelner Nervenzellen via Genkanone

Die Genkanone (engl. gene gun) wurde 1987 an der Cornell Universität von KLEIN, WOLF und SANFORD (KLEIN et al., 1987) ursprünglich für die Transformation von Pflanzenzellen entwickelt. Es handelt sich dabei um ein Gerät bzw. eine „Kanone“, mit deren Hilfe „Mikroprojekteile“ durch hohen Druck in Zellen geschossen werden können. Dementsprechend wird dieses Verfahren auch als Partikelbeschuss-Technik (particle bombardment), ballistische oder biolistische Methode (zusammengesetzt aus bio und ballistisch) bezeichnet (SANFORD et al., 1993). Als Mikroprojekteile setzten KLEIN und Kollegen Wolfram-Partikel (\varnothing 4 μ m) ein, die als Träger fungierten und mit RNA- oder DNA-Molekülen beschichtet waren, um diese fremde Nukleinsäure via Hochgeschwindigkeit in den Nukleus von Pflanzenzellen einzubringen und dort die Expression der Plasmid- bzw. Fremd-Gene zu induzieren (KLEIN et al., 1987). 1990 wurde die Gene Gun erstmals für *in vivo*-Experimente eingesetzt, um Säuger-Zellen von Maus und Ratte zu transfizieren (YANG et al., 1990). Darüber hinaus wurde die Verwendung der Gene Gun auch für die Markierung von Säugerzellen mittels lipophiler Carbocyanin-Farbstoffe verifiziert (O'BRIEN & LUMMIS, 2004), wodurch z. B. zahlreiche Neurone innerhalb weniger Minuten simultan visualisiert werden können (vgl. Tab. 1). In diesem Fall sind die als Mikroträger dienenden Wolfram- oder Goldpartikel anstelle der Nukleinsäure mit einem Farbstoff ummantelt, weshalb hier auch von der „diolistischen Methode“ („diolistic labelling“, zusammengesetzt aus DiO = 3,3'-Diocetadecyloxacarbocyaninperchlorat, ein vielfach eingesetzter Farbstoff, und ballistisch) gesprochen wird. Bedingt durch ihre Lipophilie zeigen die Carbocyanin-Farbstoffe in Wasser nur eine schwache Fluoreszenz, während sie in Lipiden, z. B. nach Einlagerung in die Lipiddoppelschicht der Zellmembranen, nach adäquater Anregung stark fluoreszieren. Nach der Einlagerung in die Membranen breiten sich die Farbstoffe mittels passiver Diffusion entlang dieser aus und dienen bei intakten Zellmembranen somit als zuverlässige Tracer der Zellmorphologie. Gemäß der natürlichen Lipidmobilität diffundieren die Farbstoffe passiv mit einer Geschwindigkeit von etwa 6 mm/Tag in lebendem und ca. 0,2 - 0,6 mm/Tag in fixiertem Gewebe (O'BRIEN & LUMMIS, 2006). Das rasche Verfügbarmachen von Ergebnissen sowie die relativ einfache Handhabung zeichnen das diolistische Verfahren beispielsweise gegenüber der gängigen Golgi-Färbung (langwierige Inkubation und Trocknung des Gewebes) wie auch dem Einsatz transgener Tiere (Abwarten der Genexpression) aus. Ein weiterer Vorteil (s. Tab. 1) besteht darin, dass es sich um eine nicht toxische Färbemethode handelt, die sowohl auf

lebendes (z. B. Zellkulturen) als auch fixiertes Gewebe (z. B. Koronarschnitte) anwendbar ist (GAN et al., 2000; O'BRIEN & LUMMIS, 2006) und höchstens mit einer minimalen Zellbeschädigung einhergeht (O'BRIEN & LUMMIS, 2004). Auch die Carbocyanin-Farbstoffe selbst wirken sich nicht modifizierend auf die Zelleigenschaften aus (O'BRIEN & LUMMIS, 2006). Die Tatsache, dass die diolistische Markierung keine zelltypspezifische Kennzeichnung darstellt, kann sowohl von Vor- als auch von Nachteil sein (vgl. Tab. 1). Einerseits ist die Methode dadurch vielfältig einsetzbar, andererseits müssen die gewünschten Zellen (z. B. hippokampale Pyramidenneurone) nach dem Farbstoff-Beschuss anhand ihrer morphologischen Charakteristika identifiziert und von anderen angefärbten Zelltypen (z. B. Interneurone, Astrozyten) differenziert werden. Die mit der diolistischen Methode einhergehende zufällige Zellmarkierung kann ebenfalls als vor- bzw. nachteilhaft gewertet werden. Wie bei der Golgi-Färbung besteht der Nutzen darin, dass aufgrund der Zufallsmarkierung die Visualisierung von Einzelzellen gewährleistet wird, so dass deren Morphologie präzise erkannt und untersucht werden kann. Dennoch muss in diesem Zusammenhang auch auf die variierende Effizienz der diolistischen Methode verwiesen werden. Das bedeutet, dass neben Hirnschnitten, die zahlreiche gut markierte Zellen beinhalten, durchaus auch „leere Schnitte“ vorliegen können, in denen kaum oder sogar keine Zellen des Interesses detektiert werden können. Eine klare Einbuße stellt bei dem diolistischen Verfahren die Gefahr des Ausbleichens der fluoreszenzmarkierten Strukturen dar. Wie bei der Verwendung von Fluorochromen allgemein üblich, sollte mit den markierten Präparaten möglichst im Dunkeln umgegangen werden, um die Lichteinstrahlung und das damit verbundene Risiko der Farbstoffverblassung so gering wie möglich zu halten.

Tab. 1: Vor- und Nachteile der Gene Gun-Technik

Vorteile der Gene Gun-Technik	Nachteile der Gene Gun-Technik
Markierung vieler Zellen in kurzer Zeit	variierende Effizienz
schnelle Resultate / Bildaufnahme nach Minuten möglich	Gefahr des Ausbleichens fluoreszenzmarkierter Strukturen
nicht toxisch / auch <i>in vivo</i> anwendbar	
einfache Handhabung	
Visualisierung aller Zelltypen	
zufällige Zellmarkierung	

2.5.2 Die Gene Gun-Technik in Gegenüberstellung zur Golgi-Cox-Färbung

Das erste Arbeitsziel der vorliegenden Dissertation war es, im Rahmen einer Methoden-Etablierung die bislang in der Abteilung eingesetzte Golgi-Cox-Färbung zur Quantifizierung und Differenzierung synaptischer Dornfortsätze mit der ballistischen Fluoreszenzmarkierung via Gene Gun zu vergleichen und schließlich zu substituieren. Die Golgi-Färbung („schwarze Reaktion“), welche 1873 von dem italienischen Mediziner und Physiologen Camillo Golgi (1843–1926) entdeckt wurde und v. a. aufgrund der ausgeprägten Anwendung und Weiterentwicklung durch den spanischen Mediziners Santiago Felipe Ramón y Cajal (1852-1934) schnell an Popularität gewann, ist ein histologisches Verfahren, bei dem mittels Silberimprägnierung die Gesamtmorphologie einzelner Neurone und Gliazellen im Gehirn visualisiert werden kann. Die morphologische Darstellungsmöglichkeit einzelner Zellen beruht dabei darauf, dass nach dem Zufallsprinzip mit bis heute ungeklärtem Mechanismus nur 1 - 5 % aller Neurone angefärbt werden (PANNESE, 1996; ROSOKLIJA et al., 2003). Auch heute noch ist die Golgi-Färbung eine elementare Methode, um die neuronale Morphologie, insbesondere von Dendriten sowie synaptischer Dornfortsätze, qualitativ und quantitativ zu charakterisieren (ROSOKLIJA et al., 2003). Dennoch bietet der Einsatz der Gene Gun gegenüber dem Golgi-Verfahren einige erhebliche Vorteile, weshalb die Gene Gun-Technik künftig als Verfahren der Wahl zur Visualisierung und Analyse synaptischer Dornfortsätze eingesetzt werden sollte. Als erster wesentlicher Grund für die angestrebte Substitution der Golgi-Färbung durch die Gene Gun-Methode ist die stark verkürzte Prozessdauer zu nennen. Im Falle der Golgi-Färbung sind eine sehr zeitintensive Behandlung der präparierten Gehirne mit verschiedenen Lösungen sowie eine lange Trocknungsphase der gefärbten

Koronarschnitte erforderlich, weshalb die mikroskopische Bildaufnahme bzw. die Spine-Analyse hier frühestens etwa sechs Wochen nach der Gehirnpräparation stattfinden kann. Im Gegensatz dazu erfolgt die Gene Gun-basierte Markierung innerhalb weniger Minuten, so dass theoretisch das Fotografieren geeigneter dendritischer Segmente und die anschließende Spine-Evaluation noch am selben Tag möglich sind. Neben der deutlichen Zeitersparnis sind als weitere signifikante Vorteile der Gene Gun-Technik gegenüber dem Golgi-Verfahren die Möglichkeit der automatisierten Analyse wie auch die dreidimensionale Auswertbarkeit mittels konfokaler Laser Scanning-Mikroskopie an Stelle der bisherigen zweidimensionalen Evaluation am Lichtmikroskop anzuführen. Aufgrund der Zweidimensionalität sowie der Bildqualität der lichtmikroskopischen Aufnahmen Golgi-markierter Dendriten ist in diesem Fall nur eine sehr eingeschränkte Differenzierung der verschiedenen morphologischen Spine-Klassen möglich. Genauer gesagt können lediglich Mushroom- und Filopodia-Spines im Zuge einer manuellen Auswertung eindeutig klassifiziert werden. Ferner ist bedingt durch das Fehlen der z-Ebene auch die Quantifizierung synaptischer Dornfortsätze auf zwei Ebenen begrenzt und resultiert somit in geringeren Spinezahlen verglichen mit einer 3D-Betrachtung. Mittels Fluoreszenzmarkierung neuronaler Dendriten bzw. darauf lokalisierter Dornfortsätze unter Einsatz der Gene Gun können die zu analysierenden Fotos hier unter Zuhilfenahme konfokaler Laser Scanning Mikroskopie sowie entsprechender Software in 3D erstellt werden. Daraus folgt nicht nur eine realitätsgetreuere Quantifizierung, sondern auch eine weitaus präzisere Klassifizierbarkeit der Spines, so dass neben Mushroom- und Filopodia- v. a. auch Thin- und Stubby-Spines differenziert werden können. Der Einsatz eines Spine-Analyse-Moduls zur automatisierten Spine-Quantifizierung und -Klassifizierung erleichtert und beschleunigt die dreidimensionale Auswertung erheblich.

3. Zielsetzungen dieser Dissertation

Das Ziel dieser Dissertation war es, für eine humane Erkrankung relevante Gehirnregionen in verschiedenen präklinischen Tiermodellen neurodegenerativer und -psychiatrischer Erkrankungen auf Modifikationen in der Dichte und Morphologie synaptischer Dornfortsätze zu untersuchen. Damit sollten einerseits die synaptische Plastizität in den verwendeten Tiermodellen näher beleuchtet und die Modelle neuroanatomisch charakterisiert werden. Andererseits sollten anhand der Quantifizierung und Klassifizierung verschiedener Spine-Subtypen das Verständnis pathologischer Mechanismen verbessert und weiterführende Ansatzpunkte für therapeutische Interventionen geliefert werden. Dazu wurden in der vorliegenden Arbeit zwei aufeinander aufbauende Hauptziele verfolgt.

Zunächst galt es, die diolistische Fluoreszenzmarkierung via Gene Gun zur Visualisierung der Spines zu etablieren und zu validieren. In diesem Zusammenhang war es außerdem das Ziel, zuerst die 2D-, dann die 3D-Spine-Analyse zu automatisieren, wofür ein Spine-Analyse-spezifisches Modul innerhalb der Software Definiens Architect XD schrittweise entwickelt und etabliert wurde. Aufgrund des Vorliegens von referenzierbaren Erfahrungswerten für die Spine-Analyse der hippokampalen CA1-Region auf Basis Golgi-gefärbter Koronarschnitte im APPSWE-Modell des Morbus Alzheimer wurde dieses transgene Mausmodell hier für die Verifizierung von Markierungsmethode und automatisierter 2D-Quantifizierung eingesetzt. Nachfolgend wurde sowohl die Anwendbarkeit der Verfahren auf ein präklinisches Schizophrenie-Rattenmodell (subchronische AMPH-Behandlung) validiert, als auch auf dem etablierten 2D-Algorithmus aufbauend ein automatisierter, Hirnregion-spezifischer 3D-Algorithmus entwickelt. Mit dessen Hilfe konnten die synaptischen Dornfortsätze nicht nur automatisch quantifiziert, sondern auch anhand definierter Parameter gemäß ihrer Morphologie klassifiziert werden. Damit sollte schließlich die bis dahin in der Arbeitsgruppe durchgeführte manuelle 2D-Spine-Auswertung anhand Golgi-Cox-gefärbter Spines durch die zeitlich und methodisch deutlich vorteilhaftere automatisierte 3D-Evaluation auf Basis Gene Gun-markierter Strukturen ersetzt werden.

Nach der Etablierung des Markierungs- und 3D-Analyseverfahrens wurde dieses dann im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit eingesetzt, um fünf verschiedene Maus- und Rattenmodelle der Schizophrenie neuroanatomisch zu charakterisieren und die Resultate mit bereits publizierten Daten des jeweiligen Modells bzw. der humanen Erkrankung zu verbinden. Neben zwei pharmakologisch-induzierten (AMPH, Quinp.) wurden auch zwei

neuroentwicklungsbiologische Rattenmodelle (MAM, Poly I:C) sowie ein genetisches Mausmodell (mhD/SC1) in die Untersuchung eingeschlossen. Mit Ausnahme des AMPH-Modells existieren für die zuvor genannten Schizophrenie-Modelle keine oder nur sehr wenige Befunde über quantitative Spine-Veränderungen. Angaben über strukturelle Alterationen der Spines, d. h. über Modifikationen einzelner Spine-Klassen, fehlen völlig. Demnach wurde die in der vorliegenden Dissertation durchgeführte automatisierte 3D-Spine-Quantifizierung und -Klassifikation im PFC, Striatum, NAcc (Kern- und Schalenregion) und in CA1 (apikale und basale Dendriten) erstmals auf die fünf o. g. Tiermodelle angewendet und lieferte somit neue Erkenntnisse über mögliche morphologische Auswirkungen des jeweiligen Insults, die wiederum Rückschlüsse auf eine Beeinflussung der synaptischen Aktivität erlaubten. Die Studienergebnisse sollten zum einen das bisherige Wissen über die verschiedenen Schizophrenie-Modelle erweitern und gültige Hypothesen stützen bzw. widerlegen. Zum anderen galt es zu prüfen, ob und inwieweit sich die tierexperimentell gewonnenen Daten mit denen der humanen Krankheit decken. Diesbezüglich ist die präklinische Darstellbarkeit der in verschiedenen Gehirnnarealen von Schizophrenie-Patienten *post mortem* nachgewiesenen Modifikationen der Spines von großer Bedeutung, um darauf basierend die Entwicklung optimierter Therapiemaßnahmen vorantreiben zu können. Besonders unter Berücksichtigung der Relevanz der Spines für die korrekte synaptische Transmission und der Lokalisation spezifischer Rezeptoren (z. B. NMDA) auf den Spine-Köpfen war zu erwarten, dass aus der detaillierten Spine-Analyse nicht nur neue strukturelle, sondern auch biochemische Ergebnisse hervorgehen.

Zur neuroanatomischen Charakterisierung der Tiermodelle wurde die automatisierte 3D-Spine-Analyse zur Beurteilung der Quantität und Morphologie synaptischer Dornfortsätze durch die Sholl-Analyse zur Untersuchung der dendritischen Komplexität und/oder die immunhistochemische Quantifizierung PV⁺ Interneuronpopulationen ergänzt. Für jedes Tiermodell wurden mindestens zwei dieser Parameter in Gehirnnarealen ausgewertet, die mit einer Erkrankung an Schizophrenie assoziiert und z. B. für Prozesse der Kognition und Emotionalität von Bedeutung sind. Die Tiere der zwei pharmakologisch-induzierten Schizophrenie-Modelle (AMPH, Quinp.) wurden außerdem mit Hilfe des Open Field-Tests auf lokomotorische Hyperaktivität als schizophrenes Positivsymptom untersucht. Damit sollte ein erwartetes Verhaltensphänomen auf einen Zusammenhang mit möglichen neuroanatomischen Veränderungen überprüft werden.

4. Material und Methoden

Die Detailangaben der für sämtliche Methoden benötigten Materialien, Substanzen und Geräte sowie der verwendeten Computerprogramme sind am Ende dieses Kapitels unter Punkt 4.5 tabellarisch zusammengefasst und werden deshalb im Text nur eingeschränkt genannt.

4.1 Tierexperimentelle Arbeiten

4.1.1 Die Versuchstiere

4.1.1.1 Das präklinische Tiermodell des Morbus Alzheimer

Für die Untersuchung synaptischer Dornfortsätze im Vorderhirn eines präklinischen Mausmodells des Morbus Alzheimer wurden weibliche transgene APPSWE-Mäuse (Amyloid-Vorläuferprotein mit Schwedischer Mutation) der Linien Tg2576 bzw. Tg2789 verwendet (Taconic, Ejby, DK). Während die ursprüngliche Linie Tg2576 (B6;SJL-Tg(APPSWE)2576Kha) einen gemischten genetischen Hintergrund besitzt (B6;SJL), liegt bei der neueren Linie Tg2789 (129S6.Cg-Tg(APPSWE)2576Kha N20+?) ein Inzucht-Hintergrund vor (129S6). Es wurden jeweils 12 acht (Tg2576) und 14 Monate (Tg2789) alte Tiere herangezogen, von denen sechs je Altersgruppe als Kontrollen dienten.

4.1.1.2 Die präklinischen Tiermodelle der Schizophrenie

4.1.1.2.1 Das Amphetamin- und Quinpirol-Modell

Zur pharmakologischen Induktion Schizophrenie-typischer Symptome in der Ratte mittels Amphetamin- oder Quinpirol-Applikation wurden männliche, zu Beginn der jeweiligen Studie etwa neun Wochen alte Sprague Dawley Ratten (Janvier Labs, Centre d'Élevage R. Janvier, Le Genest Saint Isle, F) verwendet. Für die AMPH-Studie wurden insgesamt 32 Ratten eingesetzt, die am ersten Versuchstag (s. u. Abschnitt 4.1.2.1) ein Körpergewicht (KGW) zwischen 368 g und 426 g und am letzten Versuchstag zwischen 422 g und 502 g hatten. Für das Quinp.-Experiment wurden 24 Ratten herangezogen, die am ersten Testtag (s. u. Abschnitt 4.1.2.2) zwischen 235 g und 265 g bzw. am letzten Testtag zwischen 405 g und 474 g wogen.

4.1.1.2.2 Das *DISC1*-Modell

Für die neuroanatomische Evaluation der genetischen Auslösung schizophrener Symptome via induzierbarer Expression des mutierten *hDISC1*-Gens wurden männliche Mäuse der Linie 1001 des bitransgenen Stammes CaMKII-tTA x tet-*hDISC1* herangezogen. Tiere der Mauslinie 1001, in denen das mutierte *hDISC1*-Gen stark exprimiert wird, besitzen aufgrund entsprechender Verpaarung einen aus drei Stämmen gemischten genetischen Hintergrund (B6;SJL;CBA) (PLETNIKOV et al., 2008). Als Kontrollen dienten männliche einzeltransgene CaMKII-tTA-Mäuse. Die Generation der induzierbaren Mauslinie erfolgte an der Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA (PLETNIKOV et al., 2008). Insgesamt wurden sieben einzeltransgene sowie sieben doppeltransgene Mäuse eingesetzt, die generell ein Alter von 7,5 Monaten aufwiesen.

Nach dem Transport und der Ankunft der Tiere wurde ihnen vor Versuchsbeginn eine einwöchige Akklimatisierungsphase eingeräumt. Nach Spezies getrennt wurden alle Nager einzeln mit Enrichment in Makrolonkäfigen Typ II (Mäuse) bzw. Typ III (Ratten) unter Standardbedingungen bei 21 ± 1 °C Lufttemperatur sowie 55 ± 15 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Als Einstreu diente Fichtenholzgranulat (Lignocel FS 14, Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, D). Den Tieren wurde ad libitum Zugang zu Wasser (Leitungswasser) und Nahrung (Standard-Haltungsfutter Rat/Mouse Maintenance 10 mm Pellets, Ssniff Spezialdiäten GmbH, D) gewährt. Alle Versuche wurden etwa zur gleichen Tageszeit während der Lichtphase eines 12-stündigen Hell-Dunkel-Zyklus (Licht an 6:00; Licht aus 18:00 MEZ) durchgeführt, wodurch die Einflussnahme zirkadianer Faktoren weitgehend unterbunden wurde. Das Futter aller Nager wurde einmal pro Woche, das Wasser zweimal je Woche erneuert und die Tiere einmal wöchentlich in frische Käfige umgesetzt. Alle Tierexperimente standen unter ständiger Aufsicht des Tierschutzbeauftragten des Unternehmens Abbott GmbH & Co. KG bzw. AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG, Dr. rer. nat. Stefan Hergenroeder, und wurden dem Regierungspräsidium in Mainz angezeigt bzw. von diesem genehmigt (AZ A1/07 und A2/92).

4.1.1.2.3 Das MAM-Modell

Die neurotoxische Induktion der schizophrenen Symptomatik durch die pränatale Behandlung mit 25 mg/kg KGW MAM intraperitoneal (i.p.) an Trächtigkeitstag 17 (engl.

gestation day, GD 17) wurde unter Verwendung von weiblichen Sprague Dawley-Ratten (Charles River, Portage, Michigan, USA) vorgenommen. Die Haltung der Versuchstiere, deren verhaltenspharmakologische Untersuchung im Alter von 19 Wochen wie auch die transkardiale Perfusion wurden von Abbott Laboratories, Neuroscience Research, Abbott Park, Chicago, Illinois, USA durchgeführt (BROWN et al., 2013). Die experimentellen Methoden wurden von der Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC International) akkreditiert und vom Abbott Laboratories Institutional Animal Care and Use Committee genehmigt. Nach der Perfusion wurden die Gehirne von fünf pränatal mit MAM behandelten Ratten und von sechs Vehikelkontrollen zur neuroanatomischen Analyse nach Deutschland verschickt. Der gekühlte Transport erfolgte in mit PBS (0,01 M phosphatgepufferte 0,9 % Kochsalzlösung, pH-Wert 7,6) gefüllten Schraubgläsern.

4.1.1.2.4 Das Poly I:C-Modell

Die auf der Aktivierung des maternalen Immunsystems beruhende Induktion Schizophrenie-typischer Symptome in den entsprechenden Nachkommen wurde unter Einsatz von 19 männlichen Wistar-Ratten (Harlan Laboratories Ltd., Jerusalem, Israel) in vier unterschiedlichen Behandlungsgruppen durchgeführt. Die Tierhaltung sowie sämtliche tierexperimentelle Arbeiten fanden im Department of Psychology, Tel-Aviv University, Tel-Aviv, Israel statt (PIONTKEWITZ et al., 2011; PIONTKEWITZ et al., 2012) und standen sowohl mit den Richtlinien des Institutional Animal Care and Use Committee der Tel-Aviv University, Israel als auch mit denen der National Institutes of Health (NIH) in Einklang. Nach der transkardialen Perfusion der Nager am postnatalen Tag 48 (engl. postnatal day, PND) wurden die Gehirne halbiert und jeweils beide Hemisphären separat in mit PBS gefüllten Schraubgläsern gekühlt nach Deutschland versandt. Hier erfolgte im Rahmen der vorliegenden Dissertation die neuroanatomische Charakterisierung der Versuchstiere.

4.1.2 Experimentelles Design

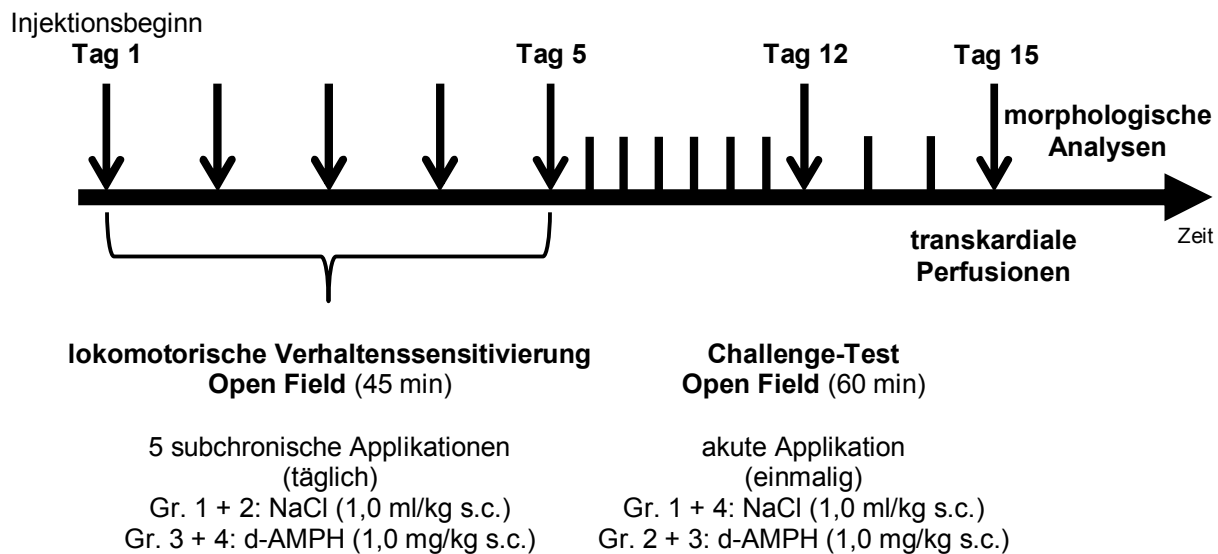
4.1.2.1 Das Versuchsdesign der Amphetamin-Studie

Die Intention dieser Studie war es, mittels subchronischer Applikation von AMPH auf pharmakologischem Wege Schizophrenie-typische Symptome im Rattenmodell zu generieren. Die Effekte der Substanzadministration sollten sowohl hinsichtlich des lokomotorischen Verhaltens der Tiere als auch in Bezug auf die neuroanatomische

Organisation evaluiert werden. Für die Durchführung des Experiments wurden 32 männliche Sprague Dawley-Ratten in vier verschiedene Behandlungsgruppen mit je acht Tieren unterteilt (vgl. Tab. 2). Wie in Abbildung 6 dargestellt, wurden alle Nager an fünf konsekutiven Tagen (Versuchstage 1-5) einmal täglich gemäß ihrer Gruppenzugehörigkeit subkutan (s.c.) mit Vehikel (physiologische Kochsalzlösung, 0,9 % Natriumchlorid, NaCl) bzw. AMPH behandelt und danach ihre lokomotorische Aktivität mit Hilfe des Open Field (OF)-Tests für 45 min überprüft und automatisch aufgezeichnet. Nach der letzten Applikation an Versuchstag fünf blieben die Tiere für eine Woche unbehandelt, bevor an Tag 12 eine erneute Injektion mit sich anschließendem OF-Test für 60 min vorgenommen wurde (Challenge-Test; vgl. Abb. 6). An Tag 15 erfolgten die transkardiale Perfusion der Versuchstiere sowie die Präparation der Gehirne, welche für die morphologischen Analysen auf histologischer wie auch diolistischer Basis koronar geschnitten wurden. Schließlich wurden sowohl die Verhaltensdaten als auch die Resultate der neuroanatomischen Evaluationen statistisch ausgewertet (vgl. 4.4 Statistik).

Die Ratten der ersten Versuchsgruppe (Gr. 1, s. Abb. 6 und Tab. 2) dienten als Kontrollen und wurden an allen Applikationstagen ausschließlich mit NaCl behandelt (1 ml/kg KGW s.c.; NaCl-NaCl). Der zweiten Versuchsgruppe (Gr. 2) wurde an den Tagen 1-5 ebenfalls NaCl verabreicht (1 ml/kg KGW s.c.), jedoch erhielten diese Nager an Tag 12 (Challenge-Test) eine einmalige AMPH-Gabe (1 mg/kg, 1 ml/kg KGW s.c.; NaCl-AMPH) und wurden damit einer akuten AMPH-Behandlung unterzogen. Die 3. Gruppe (Gr. 3) umfasste die ausnahmslos an allen Applikationstagen mit AMPH injizierten, d. h. die subchronisch behandelten Tiere (1 mg/kg KGW s.c.; AMPH-AMPH). Auch den noch verbleibenden acht Ratten (Gr. 4) wurde an den Tagen 1-5 AMPH subchronisch verabreicht (1 mg/kg KGW s.c.), jedoch erhielten diese Tiere beim Challenge-Test (Tag 12) eine einmalige Vehikelinjektion (1 ml/kg KGW s.c.; AMPH-NaCl). Es wurde erwartet, dass die entsprechenden Versuchstiere während der wiederholten, subchronischen AMPH-Gabe eine Substanz-induzierte lokomotorische Verhaltenssensitivierung (Hyperaktivität) entwickeln (z. B. SALOMON et al., 2006; ROBINSON et al., 1998; WOLF, 1998) die anhand des OF-Tests kontrolliert werden sollte. Darüber hinaus galt es, das tatsächliche Vorhandensein der Sensitivierung, d. h. eine andauernde Hyperaktivität der Tiere als Antwort auf eine erneute AMPH-Injektion, nach einer einwöchigen Applikationspause mit Hilfe des Challenge-Tests im OF an Versuchstag 12 zu verifizieren.

Abb. 6: Experimentelles Design der Amphetamin-Studie



Tab. 2: Die für die AMPH-Studie eingesetzten Versuchstiergruppen

Versuchsgruppe	Tierzahl (n)	Behandlung
Gr. 1: NaCl-NaCl	8	ausschließlich NaCl
Gr. 2: NaCl-AMPH	8	Tage 1-5: NaCl Tag 12: AMPH
Gr. 3: AMPH-AMPH	8	ausschließlich AMPH
Gr. 4: AMPH-NaCl	8	Tage 1-5: AMPH Tag 12: NaCl

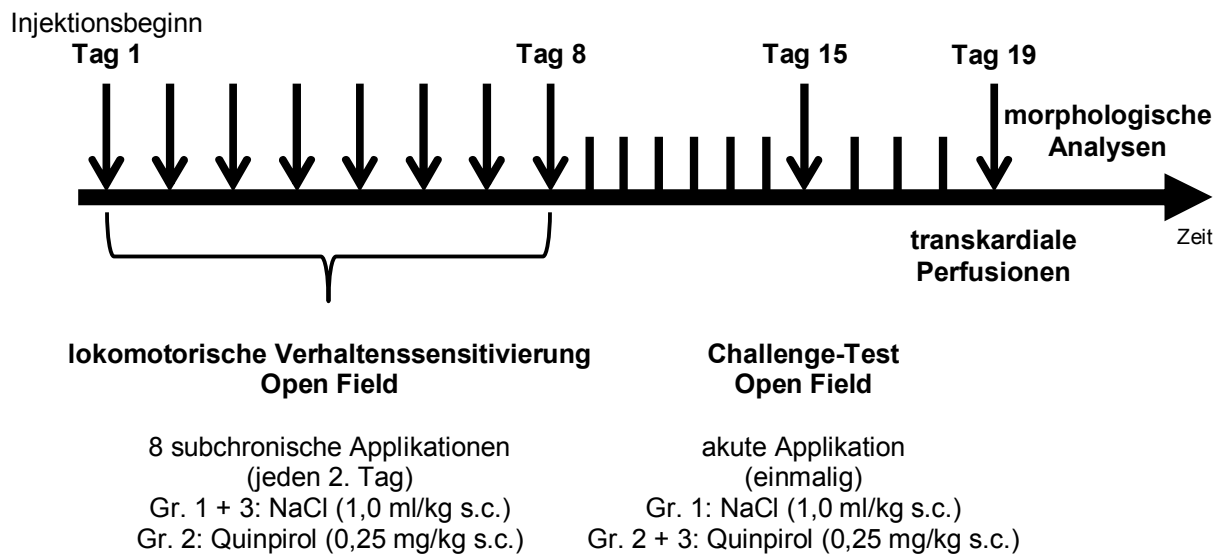
4.1.2.2 Das Versuchsdesign der Quinpirol-Studie

Analog zum Amphetamin-Versuch war es das Ziel dieses Experiments, auf der Grundlage einer subchronischen Behandlung mit Quinpirolhydrochlorid Schizophrenie-typische Symptome im Rattenmodell pharmakologisch zu induzieren und nachfolgend die Substanz-basierten Veränderungen der Lokomotion wie auch die morphologischen Modifikationen spezifischer Hirnstrukturen zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden 24 männliche Sprague Dawley-Ratten verwendet, die in drei differente Behandlungsgruppen zu je acht Nagern eingeteilt wurden (vgl. Tab. 3). Das in Abbildung 7 repräsentierte experimentelle Design sah vor, den Versuchstieren, je nachdem welcher Gruppe sie zugeteilt worden waren, jeden zweiten Tag entweder Vehikel (0,9 % NaCl) oder Quinp. s.c. zu verabreichen und anschließend ihr lokomotorisches Verhalten anhand eines 90-minütigen OF-Tests zu erfassen. Insgesamt wurden alle Ratten acht Mal injiziert und getestet (Versuchstage 1-8) bevor sich eine einwöchige Applikationspause anschloss. An

Tag 15 fand abermals eine Injektion mit nachfolgendem OF-Test für 90 min statt (Challenge-Test; vgl. Abb. 7). Im Anschluss daran wurden die Tiere an Tag 19 transkardial perfundiert und die Gehirne für die spätere Anfertigung der Koronarschnitte entnommen. Nach der Evaluation der synaptischen Dornfortsätze diverser Hirnregionen sowie der histologischen Schnittauswertung wurden die drei Versuchsgruppen abschließend anhand der Daten aus der Verhaltens- und Morphologie-Analyse statistisch miteinander verglichen (s. 4.4 Statistik).

Bei der ersten Versuchsgruppe (Gr. 1, s. Abb. 7 und Tab. 3) handelte es sich um die Kontroll- bzw. Vehikeltiere, welchen sowohl an den Tagen 1 - 8 als auch an Tag 15 (Challenge-Test) NaCl injiziert wurde (1 ml/kg KGW s.c.; NaCl-NaCl). Im Gegensatz dazu wurden die Ratten der zweiten Gruppe (Gr. 2) insgesamt neun Mal mit Quinp. appliziert (0,25 mg/kg, 1 ml/kg KGW s.c.; Quinp.-Quinp.), weshalb sie die subchronische Behandlungsgruppe darstellten. Die zu Gruppe drei (Gr. 3) gehörigen Nager erhielten zwar an den Versuchstagen 1-8 jeweils eine Vehikel-Gabe (1 ml/kg KGW, s.c.), allerdings wurde ihnen nach der einwöchigen Pause beim Challenge-Test (Tag 15) einmalig, d. h. akut, Quinp. verabreicht (0,25 mg/kg, 1 ml/kg KGW, s.c.; NaCl-Quinp.). Entsprechend der AMPH-induzierten Verhaltenssensitivierung wurde angenommen, dass sich während der subchronischen Quinp.-Administration (Tage 1-8) in den Tieren ebenfalls eine durch die Substanz ausgelöste Verhaltenssensitivierung, genauer gesagt eine lokomotorische Hyperaktivität, etabliert (z. B. SULLIVAN et al., 1998; DVORKIN et al., 2008), welche unter Zuhilfenahme des OF-Tests visualisiert werden sollte. Nach dem einwöchigen Aussetzen der Behandlung galt es, eine erfolgreiche Sensitivierung, d. h. eine anhaltende Hyperaktivität der Tiere als Reaktion auf eine abermalige Quinp.-Applikation, anhand des Challenge-Tests im OF an Tag 15 nachzuweisen.

Abb. 7: Experimentelles Design der Quinpirol-Studie



Tab. 3: Die für die Quinpirol-Studie eingesetzten Versuchstiergruppen

Versuchsgruppe	Tierzahl (n)	Behandlung
Gr. 1: NaCl-NaCl	8	ausschließlich NaCl
Gr. 2: Quinp.-Quinp.	8	ausschließlich Quinpirol
Gr. 3: NaCl-Quinp.	8	Tage 1-8: NaCl Tag 15: Quinpirol

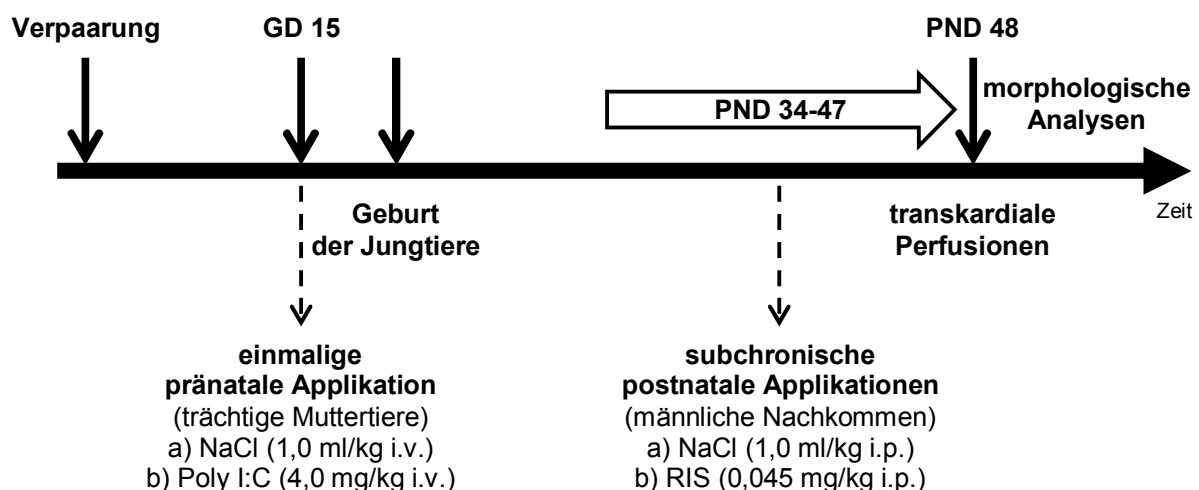
4.1.2.3 Das Versuchsdesign der Poly I:C-Studie

Bevor auf das experimentelle Design des Poly I:C-Versuchs eingegangen wird, ist darauf hinzuweisen, dass sämtliche *in vivo*-Arbeiten einschließlich der transkardialen Perfusion im Labor von Frau Prof. Dr. Ina Weiner (Department of Psychology, Tel-Aviv University, Tel-Aviv, Israel) stattfanden und ausschließlich die morphologischen Analysen Bestandteil der vorliegenden Dissertation waren.

Der Zweck dieser Studie war einerseits, durch die pränatale Applikation von Poly I:C eine maternale Infektion während der Schwangerschaft als Umwelt-Risikofaktor für die Entstehung von Schizophrenie in den Nachkommen tierexperimentell zu simulieren. Andererseits sollten mögliche Poly I:C-induzierte Defizite mit Hilfe einer postnatalen subchronischen Behandlung mit Risperidon (RIS), einem atypischen Neuroleptikum, kompensiert werden. Für die Umsetzung des Experiments wurden zunächst Wistar-Ratten im Alter von drei Monaten verpaart und der erste Tag nach der Kopulation als erster Trächtigkeitstag (GD 1) definiert (PIONTKEWITZ et al., 2011; PIONTKEWITZ et al., 2012). An

GD 15 (vgl. Abb. 8) wurde den trächtigen Muttertieren einmalig entweder Vehikel (0,9 % NaCl, 1 ml/kg KGW) oder Poly I:C (4,0 mg/kg, 1 ml/kg KGW) intravenös (i.v.) in die Schwanzvene injiziert. Nach der Geburt und dem Absetzen der Jungtiere an PND 21 wurde an PND 34 mit der präventiven RIS-Applikation begonnen (s. Abb. 8). Für die postnatale subchronische Behandlung mit dem Neuroleptikum wurden ausschließlich männliche Ratten herangezogen. Im Zeitraum von PND 34 bis 47, was der Adoleszenz der Tiere entspricht (PIONTKEWITZ et al., 2011; PIONTKEWITZ et al., 2012), wurde sowohl den Nachkommen von NaCl- als auch denen von Poly I:C-behandelten Müttern einmal täglich entweder Vehikel (1 ml/kg KGW) oder RIS (0,045 mg/kg, 1 ml/kg KGW) i.p. verabreicht (vgl. Abb. 8). Demnach wurden beide pränatal bzw. maternal applizierten Substanzen (NaCl bzw. Poly I:C) mit je zwei postnatalen Injektionsmöglichkeiten (NaCl bzw. RIS) kombiniert, woraus sich zum einen die Gruppen NaCl-NaCl (Gr. 1) und NaCl-RIS (Gr. 3), zum anderen die Gruppen Poly I:C-NaCl (Gr. 2) sowie Poly I:C-RIS (Gr. 4) ergaben. Somit lagen vier verschiedene Tiergruppen á fünf Tiere vor, die in Tabelle 4 zusammengefasst sind. Nach Abschluss der postnatalen Applikationsperiode wurden die Ratten an PND 48 (späte Adoleszenz) transkardial perfundiert, die Gehirne halbiert und zur morphologischen Evaluation nach Deutschland verschickt. Nach der Anfertigung koronarer Hirnschnitte erfolgte neben der Analyse der synaptischen Dornfortsätze spezifischer Hirnareale außerdem die Untersuchung der dendritischen Komplexität bestimmter Neurone sowie die abschließende statistische Auswertung aller gewonnenen Daten (vgl. 4.4 Statistik).

Abb. 8: Experimentelles Design der Poly I:C-Studie



Tab. 4: Die für die Poly I:C-Studie eingesetzten Versuchstiergruppen

Versuchsgruppe	Tierzahl (n)	Behandlung
Gr. 1: NaCl-NaCl	5	prä- und postnatal NaCl
Gr. 2: Poly I:C-NaCl	5	pränatal Poly I:C postnatal NaCl
Gr. 3: NaCl-RIS	5	pränatal NaCl postnatal Risperidon
Gr. 4: Poly I:C-RIS	5	pränatal Poly I:C postnatal Risperidon

4.1.3 Der Open Field-Test

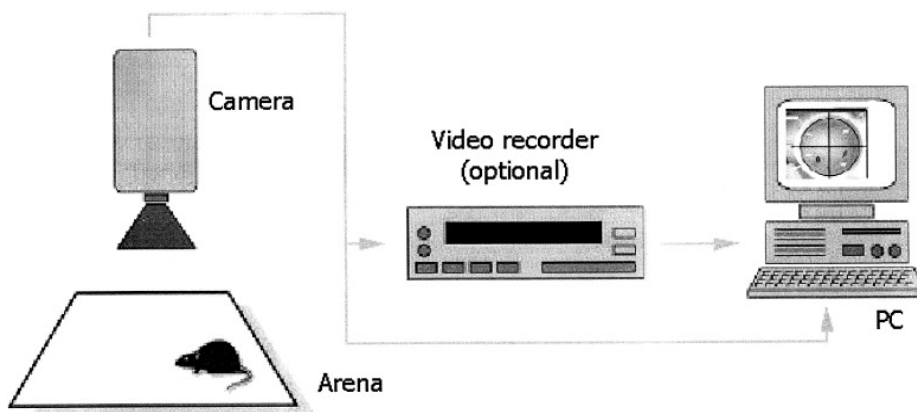
Der Test im Open Field (Offenfeld, „Test im freien Feld“) wird eingesetzt, um anhand diverser Parameter das Explorationsverhalten sowie die generelle Aktivität und Lokomotion von Versuchstieren sowohl qualitativ als auch quantitativ zu untersuchen (GOULD et al., 2009). Die Versuchsgrundlage ist die Konfrontation der Tiere mit einer neuen, offenen und relativ großen Umgebung bzw. Testarena, in der sich die Tiere frei bewegen können (WALSH & CUMMINS, 1976), die jedoch keinerlei Rückzugs- bzw. Deckungsmöglichkeiten bietet. Die Arena wird von umgebenden Wänden begrenzt, so dass die Tiere dieser Situation nicht entfliehen können. Eingeführt 1932 von HALL und BALLACHEY wird der OF-Test heute häufig herangezogen, um beispielsweise eine angstlösende, stimulierende (u. a. Amphetamin) oder auch sedierende Wirkung von Substanzen und potentiellen Medikamenten tierexperimentell zu evaluieren (PRUT & BELZUNG, 2003). Trotz der Popularität des Tests ist das Versuchsprotokoll nur wenig standardisiert und kann durch diverse Variablen beeinflusst werden, dazu zählen u. a. die Größe, Form, Farbe und Beleuchtung sowie das Material der Testarena, die Dauer des Tests wie auch die Versuchstiere selbst (z. B. Alter, Geschlecht, Genetik, Haltung) (GOULD et al., 2009). Aufgrund dieser Variabilität müssen die methodischen Parameter bei einem Datenvergleich verschiedener OF-Tests stets berücksichtigt werden. Neben dem einmaligen Test im OF kann dieser auch wiederholt durchgeführt werden, um eine Substanz-induzierte Verhaltenssensitivierung zu untersuchen (GOULD et al., 2009), was in der vorliegenden Arbeit der Fall war. Hier wurde der Verhaltenstest, dessen Versuchsaufbau in Abbildung 9 skizziert ist, sowohl im Rahmen der AMPH- als auch der Quinp.-basierten pharmakologischen Induktion Schizophrenie-typischer Symptome zur Überprüfung der applikationsbedingten Hyperaktivität der entsprechenden Versuchstiere eingesetzt. In beiden Studien wurde der OF-Test zuerst in der Entwicklungsphase der

lokomotorischen Verhaltenssensitivierung während wiederholter Substanzinjektion angewendet und fand anschließend abermals zur Überprüfung des Vorhandenseins der Sensitivierung (lokomotorische Hyperaktivität der Ratten) anhand des Challenge-Tests nach einwöchiger Applikationspause Anwendung. Die Ausführung des OF-Tests fand allerdings für beide Experimente in unterschiedlichen Versuchsräumen statt. Während im Rahmen der AMPH-Studie die Applikation sowie die Unterbringung sämtlicher Tiere in dem Raum vorgenommen wurde, in dem auch der OF-Test erfolgte, befanden sich die OF-Arenen für das Quinp.-Experiment in einem separaten Versuchsraum. Hier waren die Applikation sowie die Aufbewahrung aller aktuell nicht getesteten Ratten isoliert in einem Vorraum möglich. Nachdem die Tiere am jeweiligen Testtag aus dem Tierhaus in den Raum transportiert worden waren, wurde ihnen eine Akklimatisierungszeit von 30 min eingeräumt, bevor mit der Injektion und dem Verhaltenstest begonnen wurde. Für die AMPH-Studie standen vier, für den Quinp.-Versuch acht identische Testarenen zur Verfügung, bei denen es sich um quadratische schwarze Polyethylen-Boxen (Elgema Kunststoffverarbeitung GmbH, D) in den Maßen 61 x 61 cm, Höhe 35 cm (AMPH) bzw. 40 x 40 cm, Höhe 35 cm (Quinp.) handelte. Die nebeneinander auf dem Fußboden platzierten Testboxen befanden sich in einem leicht abgedunkelten Labor, so dass mittig am Boden der einzelnen Testarenen eine Beleuchtungsstärke von acht bis zehn Lux herrschte. Über den Boxen war eine Videokamera (Santec VTC-642DNP, Sanyo Video Vertrieb AG, D) angebracht, die in Kombination mit der Tracking-Software Noldus EthoVision Version 3.1.16 (Noldus InformationTechnology, NL) der automatischen Ermittlung der Lokomotion der Ratten während des Tests diente. Aufgrund des Vorhandenseins von vier (AMPH) bzw. acht (Quinp.) identischen OF-Arenen, war es möglich, je Versuchsdurchgang die lokomotorische Aktivität von vier bzw. acht Ratten simultan aufzuzeichnen. Bezüglich des AMPH-Experiments handelte es sich dabei um ein Tier je Gruppe. Die Quinp.-Studie betreffend blieb die Abfolge der Gruppen immer gleich, so dass jeweils nacheinander ein Tier der NaCl-NaCl-, der Quinp.-Quinp.- sowie der NaCl-Quinp.-Gruppe appliziert und getestet wurde. Alle Ratten wurden sofort nach der Applikation einzeln mittig in die OF-Boxen gesetzt und die Software-gesteuerte Dokumentation der individuellen Gesamtlaufstrecke während des 45-, 60- oder 90-minütigen Tests umgehend nach dem Hineinsetzen des letzten Tieres gestartet. Auf Grundlage der mittels Noldus EthoVision erfassten Gesamtlaufstrecke [cm] während des Tests konnten Rückschlüsse auf die AMPH- bzw. Quinp.-induzierte lokomotorische Hyperaktivität im Vergleich zum Laufverhalten der Vehikeltiere (0,9 % NaCl) gezogen und außerdem die

Verhaltenssensitivierung überprüft werden. Nach jedem Testlauf wurden Kot und Urin mit Zellstofftüchern aus den Boxen entfernt und diese mit Ethanol-Reinigungstüchern gesäubert.

In Hinblick auf den Quinp.-Versuch ist darauf hinzuweisen, dass der Verhaltenstest im OF nur an den Versuchstagen 1, 2, 5, 6, 8 und 15 nach der Substanzgabe durchgeführt wurde. An den verbleibenden Tagen 3, 4 und 7 wurden die Ratten zwar gleichermaßen in den Versuchsraum verbracht und nach der 30-minütigen Akklimatisierungsphase ihrer Gruppenzugehörigkeit entsprechend mit NaCl oder Quinp. injiziert, jedoch wurden sie nach der Applikation wieder in ihren Heimatkäfig zurückgesetzt.

Abb. 9: Skizze des Versuchsaufbaus des Open Field-Tests



SPINK et al., 2001

In Abbildung 9 ist der Versuchsaufbau des Open Field-Tests vereinfacht skizziert. Die Lokomotion der Nager in den vier bzw. acht Testarenen wurde mittels einer über den Boxen befestigten Videokamera aufgenommen. Das Kamerasignal wurde direkt an einen Computer, auf dem die Tracking-Software Noldus EthoVision installiert war, weitergegeben und der gewünschte Parameter, d. h. die Gesamtlaufstrecke der Tiere während des jeweiligen Tests, mit Hilfe der Software erfasst. Die optionale Zwischenschaltung eines Videorekorders zur Aufzeichnung des Verhaltens fand hier nicht statt.

4.2 Histologisch Arbeiten

4.2.1 Die transkardiale Perfusion

Um die Gehirne für die anschließende histologische sowie ballistische Aufarbeitung zu gewinnen, wurden die Versuchstiere transkardial perfundiert. Zu diesem Zweck erfolgte zuerst eine Tiefenanästhesie (i.p.) der Nager mit einem Gemisch aus 100 mg/kg Ketamin und 5 mg/kg Xylazin (1 ml/kg KGW). Bei Bedarf konnte zusätzlich Sevofluran als Inhalationsnarkose verabreicht werden. Nachfolgend wurde das jeweilige Tier in gestreckter Rückenlage auf der Perfusionswanne fixiert und der Bauchraum eröffnet. Dann konnte das Herz freigelegt und die Perfusionsnadel über den linken Herzventrikel in die Aorta eingeführt werden. Dort wurde die Nadel mit dem daran befindlichen Schlauch für den Transport der Perfusionslösungen mit einer kleinen Bulldogklemme fixiert. Es wurde sofort eine Inzision in das rechte Atrium gesetzt, um den Austritt von Blut und Perfusionslösungen zu gewährleisten.

Da jeweils eine Hirnhemisphäre aller hier verwendeten Versuchstiere für die diolistische Fluoreszenzmarkierung mittels Gene Gun bestimmt war, wurde die Perfusion ausschließlich mit 20 ml (Maus) bzw. 250 ml (Ratte) PBS durchgeführt und damit das Blut aus dem Kreislauf verdrängt. Daraufhin wurden die Gehirne entnommen und für 10 min (Maus) bzw. 30 min (Ratte) in Schraubgläsern mit eisgekühltem 4%igem Formaldehyd, das als Fixans diente und jeweils am Tag der Perfusion frisch angesetzt wurde, immersionsfixiert. Danach wurden die Gehirne bis zur Herstellung der Querschnitte mit Hilfe eines Vibratoms bei 4 °C in PBS gelagert.

Sollte die jeweils zweite Hirnhemisphäre der Testtiere später histologisch aufgearbeitet werden, erfolgte nach der Gehirn-Entnahme eine 24-stündige Nachfixierung des Gewebes in mit gekühltem 4%igem Formaldehyd gefüllten Schraubgläsern bei 4 °C. Nachfolgend wurden die Gehirne in 30%ige Saccharoselösung (in PBS) überführt und so für mindestens drei Tage bei 4 °C aufbewahrt. Für das Schneiden der fixierten Hirne am Gefriermikrotom war es essentiell, dass die den Zellen als Gefrierschutz dienende Zuckerlösung das Gewebe vollständig durchdrungen hatte. Das war daran zu erkennen, dass die Gehirne nach Einstellung des Gleichgewichts zwischen Gewebe und Medium auf den Boden der Schraubgläser gesunken waren.

4.2.2 Die Anfertigung der Gehirnschnitte

Zum Zweck der immunhistochemischen Analyse mussten koronare Schnitte von den perfusionsfixierten Gehirnen angefertigt werden, was mit Hilfe eines Gefriermikrotoms (Reichert-Jung 1206 mit Kühlaggregat Frigomobil) erfolgte. Nach Abtrennung des nicht benötigten Cerebellums wurde das jeweilige Gehirn auf dem vorgekühlten Probenstisch des Mikrotoms aufgefroren und mit einer konstanten Schnittdicke von 40 µm komplett geschnitten. Die gewonnenen Querschnitte wurden studienabhängig in sechs oder acht Serien in mit PBS gefüllten 6- bzw. 12-Well-Platten gesammelt und hatten entsprechend einen Abstand von 240 µm (6 Serien) bzw. 320 µm (8 Serien) zueinander. Bis zur Durchführung der Markierung PV⁺ Interneurone konnten die Schnitte bei 4 °C in den Well-Platten gelagert werden.

Für die diolistische Zellmarkierung wurden ebenfalls Koronarschnitte der in diesem Fall immersionsfixierten Gehirne hergestellt. Die 150 µm dicken Schnitte wurden unter Verwendung eines Vibratoms (Leica VT1000S) erzeugt, nachdem das jeweilige Gehirn mittels Sekundenkleber auf dem Probenhalter fixiert worden war. Dabei diente das zuvor entfernte Kleinhirn als Stütze. Die Anfertigung der Hirnschnitte erfolgte bei einer Schneide- bzw. Vibrationsfrequenz von 55 Hz und einer Geschwindigkeit von 0,25 mm/s. Die koronaren Schnitte wurden in eisgekühltem PBS aufgefangen, zur späteren Weiterbehandlung jeweils einzeln in mit PBS gefüllte 24-Well-Platten überführt und bei 4 °C aufbewahrt.

4.2.3 Immunhistochemische Markierung Parvalbumin-positiver Interneurone

Für die immunhistochemische Quantifizierung GABAerger, PV⁺ Interneurone wurde ein primärer Antikörper (AK) gegen das Calcium-bindende Albuminprotein Parvalbumin verwendet. Die Proteinmarkierung und die finale enzymatische Visualisierung ermöglichten es, Modifikationen kortikaler sowie hippokampaler PV⁺ Interneuronpopulationen nachzuweisen und somit ein mögliches Defizit innerhalb des GABAergen Transmittersystems zu detektieren.

Die Immunhistochemie wurde nach der „free floating“-Methode in 6-Well-Platten mit 6 ml Lösung je Well durchgeführt. Jeweils eine Schnittserie aller Versuchstiere wurde für die AK-basierte Proteinmarkierung herangezogen und gemäß dem nachfolgend beschriebenen Standardvorgehen behandelt.

Für die Garantie der spezifischen Antigen-Markierung mussten im ersten Schritt des Färbeprotokolls die endogenen Peroxidasen in den Gehirnschnitten irreversibel inhibiert werden. Dazu wurden die in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) aufbewahrten Schnitte in eine Wasserstoffperoxid (H_2O_2 , 0,3 %)-Methanol-Lösung transferiert und für 30 Minuten mit dieser inkubiert. Das Methanol erleichterte dabei das Eindringen von H_2O_2 in die Zellen, da der Alkohol eine Öffnung der Membranporen bewirkte. Nach anschließendem zweimaligem Waschen der Schnitte für jeweils 5 min in Tris-gepufferter Kochsalzlösung mit 0,05 % Tween (TBST) wurden die Hirnschnitte für 20 Minuten mit einer „Blocklösung“ behandelt (5 % Eselserum in TBST-Puffer), um ungewünschte unspezifische AK-Bindungen zu verhindern. Daraufhin erfolgte die 24-stündige Inkubation mit dem primären monoklonalen anti-PV-AK (1:10000 oder 1:15000; Millipore, USA) in eselserumhaltigem (1 %) TBST-Puffer (Carrierlösung). Am nächsten Tag fand ein erneuter Spülschritt (2 x 5 min in TBST-Puffer) statt und im Anschluss daran die 30-minütige Behandlung mit dem sekundären biotinylierten AK (Esel-anti-Maus, 1:500; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., USA) in Carrierlösung. Nach wiederholtem zweimaligen Waschen (s. o.) erfolgte die Inkubation der Schnitte mit einem makromolekularen Komplex aus Avidin und biotinylierter Meerrettichperoxidase (Avidin-Biotin-Komplex-Kit PK-6100, Vectastain® Elite, Vector Laboratories, Inc., USA). Durch anschließendes Spülen (s. o.) wurden überschüssige Avidin-Biotin-Meerrettichperoxidase-Moleküle entfernt. Für die Visualisierung der AK-Konjugate bzw. der PV^+ Interneurone mittels enzymatischer Farbreaktion wurden die Schnitte nachfolgend in die dafür erforderliche H_2O_2 -haltige Substratlösung überführt. Sobald das anfangs farblose Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB; Peroxidase-Substrat-Kit SK-4100 DAB, Vector Laboratories, Inc.), welches als Indikatorsubstanz diente, zu einem rot-braunen Polymer oxidiert war, wurde die Reaktion durch Spülen mit bidestilliertem Wasser (3 x 5 min) gestoppt. Danach wurden die Schnitte in anterior-posteriorer Reihenfolge auf Objektträger (Superfrost Plus® Gold, Gerhard Menzel GmbH, D) aufgezogen, getrocknet, durch die aufsteigende Alkoholreihe (60 %, 90 %, 100 % Ethanol, jeweils 5 min) geführt, nach Trocknung für 5 min in xylolfreier Klärungsreagenz gebadet (X-TRA-Solv®) und abschließend mit Deckgläsern in UltraKitt eingedeckt.

Für die Negativkontrollen der immunhistochemischen Färbung wurde der Carrierlösung kein primärer AK zugesetzt. Die immunhistochemische Markierung der PV^+ Interneurone wurde verblindet durchgeführt.

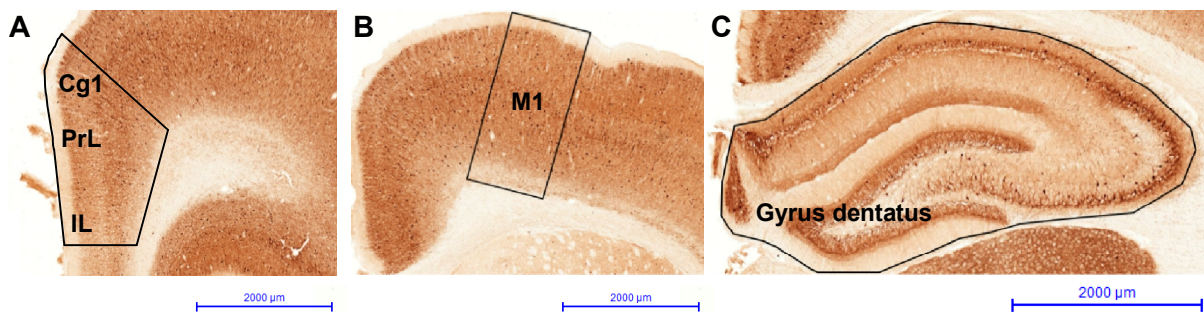
4.2.4 Histologische Quantifizierung PV⁺ Interneuronpopulationen verschiedener Gehirnareale

Um die PV⁺ Interneurone im mPFC bzw. in dessen Subregionen (cingulärer Kortex, Areal 1, Cg1; prälimbischer Kortex, PrL; infralimbischer Kortex, IL; vgl. Abb. 10, A) sowie im DLFC basierend auf dem primären Motorkortex (M1; s. Abb. 10, B) und in der dorsalen Hippokampusformation (s. u. Abb. 10, C) zu quantifizieren, wurde der prozentuale Anteil an der jeweils zugrunde gelegten Gesamtfläche ermittelt, der von den PV⁺ Zellen eingenommen wurde. Dafür wurden die immunhistochemisch aufgearbeiteten Koronarschnitte herangezogen, in denen die PV⁺ Interneurone mittels enzymatischer Farbreaktion unter Verwendung von DAB visualisiert worden waren (vgl. Abb. 10). Nach dem Eindecken der Schnitte und dem Trocknen der Objektträger wurden diese eingescannt (Mirax Scan, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, D), so dass die Auswertung auf dem Computermonitor anhand der virtuellen Präparate in Form von Schwarzweißbildern unter Zuhilfenahme der Bildanalyse-Software Image-Pro Plus® Version 5.0.0.39 (Media Cybernetics, Inc., USA) vorgenommen werden konnte. Für jedes Tier wurden pro zu evaluierendem Gebiet fünf konsekutive Schnitte ausgewählt, die sowohl für alle Tiere als auch für die diversen Studien konstant gehalten wurden. Diese umfassten insgesamt für jedes Gehirnareal einen antero-posterioren Bereich von 1200 µm (40 µm Schnittdicke x 5 Schnitte x 6 Serien) bzw. 1600 µm (40 µm Schnittdicke x 5 Schnitte x 8 Serien). In Hinblick auf Rattengehirne (AMPH-, Quinp.-, MAM-Studie) erfolgte die Schnittauswahl - jeweils bezüglich Bregma (PAXINOS & WATSON, 1998 und 2007) - für den mPFC bzw. für dessen Subregionen (Cg1, PrL, IL) im Bereich zwischen etwa 3,72 mm und 2,20 mm, für den DLFC zwischen ca. 2,28 mm und 0,72 mm und die Hippokampusformation betreffend zwischen etwa -2,52 und -3,84 mm. In Bezug auf Mausgehirne (*DISC1*-Studie) wurden die Schnitte für den mPFC zwischen ca. 2,80 mm und 1,54 mm gewählt bzw. für den DLFC zwischen etwa 1,94 mm und 0,62 mm jeweils bezüglich Bregma (PAXINOS & FRANKLIN, 2001).

In jedem Schnitt wurde die Gesamtfläche der zu untersuchenden Hirnregion in der Image-Pro-Software konturiert und die darin befindlichen Bildpunkte (Pixel), die einen Grauwert zwischen 0 (= Minimalwert, entspricht schwarz) und 220 bzw. 225 (255 = Maximalwert, entspricht weiß) einnahmen, als Gesamtpixel erfasst. Nachfolgend wurden die Pixel mit Grauwerten zwischen 0 und 65 bzw. 75 ermittelt und deren prozentualer Anteil bezogen auf die Gesamtpixel berechnet („covered area“), was dem von den PV⁺ Interneuronen eingenommenen Prozentsatz entsprach. Für jedes Tier lagen demzufolge pro Hirnregion

fünf, in seltenen Fällen auch weniger, Werte vor, aus denen für die statistische Analyse der Mittelwert gebildet wurde. Im Fall der Auswertung beider Hirnhemisphären (*DISC1*-Studie) wurde der Gesamtmittelwert beider Hälften je Tier für die Statistik zugrunde gelegt. Die histologische Quantifizierung PV⁺ Interneuronpopulationen verschiedener Gehirnareale erfolgte verblindet.

Abb. 10: Anti-Parvalbumin markierte Koronarschnitte zur Verdeutlichung der untersuchten Gehirnregionen



Die voranstehenden Fotos A-C zeigen immunhistochemisch anti-PV markierte Koronarschnitte (40 µm), in denen die Gehirnareale, in welchen die Quantifizierung der PV⁺ Interneuronpopulationen vorgenommen wurden, hervorgehoben sind. Dabei handelt es sich um den medialen präfrontalen Kortex (A), den dorsolateral-präfrontalen Kortex (B) sowie die dorsale Hippokampusformation einschließlich des Gyrus dentatus (C). Das auszuwertende Gebiet des mPFC (A) umfasste studienabhängig den cingulären Kortex, Areal 1 (Cg1), den prälimbischen (PrL) wie auch den infralimbischen Kortex (IL), während sich die Analyse des DLFC (B) auf den primären Motorkortex (M1) bezog.

4.3 Untersuchung der synaptischen Dornfortsätze und der dendritischen Komplexität

Für die Quantifizierung und Klassifizierung der synaptischen Dornfortsätze distaler Dendritensegmente diverser Gehirnnareale wie auch für die Evaluation der dendritischen Komplexität kortikaler und hippokampaler Pyramidenzellen wurden die Neurone unter Einsatz der Helios™ Gene Gun (Bio-Rad Laboratories GmbH, D) auf diolistischem Wege fluoreszenzmarkiert. Die methodischen Einzelschritte werden in den folgenden Abschnitten 4.3.1 bis 4.3.4 beschrieben.

4.3.1 Die Herstellung der mikrocarrierhaltigen Gene Gun-Patronen

Um die diolistische Fluoreszenzmarkierung der gewünschten Zellen durchführen zu können, mussten zunächst die sogenannten „Bullets“ (engl. Geschoss; Kugel) hergestellt werden. Dabei handelt es sich um Farbstoff-ummantelte Mikrocarrier, die in Schlauchstücke definierter Länge („Patronen“) einzubringen sind und deren Anfertigung im Folgenden dargestellt wird.

Zuerst wurde ein 70 cm langer Tefzel®-Schlauch (ID 2,3622 mm, AD 3,175 mm; Bio-Rad) in die „Tubing Prep Station“ (Bio-Rad) eingespannt und eine Lösung aus 20 mg Polyvinylpyrrolidon (PVP; Bio-Rad) in 40 ml Ethanol (100 %) mit Hilfe einer Spritze langsam in den Schlauch injiziert. Nach 2 min wurde die Flüssigkeit wieder abgezogen und das Schlauchinnere für 10 min mittels Stickstoffbegasung (0,3 - 0,4 Liter/min) getrocknet. In der Zwischenzeit wurden einerseits 3 mg des rot-fluoreszierenden, lipophilen Carbocyanin-Farbstoffs 1,1'-Diocetyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanin-perchlorat (DiI; Invitrogen™, USA) in 200 µl Dichlormethan (Mallinckrodt Baker B.V., NL) gelöst, andererseits wurden 100 mg Wolframpartikel (Ø 1,3 µm; Bio-Rad), welche als Mikrocarrier dienten, auf eine Glasplatte gegeben. Auf dieser wurden die Partikel mit der Farbstofflösung unter Zuhilfenahme einer Rasierklinge vermischt und möglichst dünnsschichtig auf der Platte verteilt. Nach ca. 3 min, in denen Dichlormethan vollständig evaporierte, wurde die Schicht der nun mit DiI-ummantelten Wolframteilchen vorsichtig mit einer sauberen Rasierklinge von dem Glas gekratzt sowie zerkleinert und in ein 15 ml Röhrchen mit 5 ml gereinigtem Wasser (Milli-Q^R Gradient, MerckMillipore GmbH, D) transferiert. Nach kurzer Resuspension wurde die mikroträgerhaltige Flüssigkeit für 15 min mit Ultraschall behandelt, um die Bildung großer Partikelkomplexe zu verhindern, hinterher abermals resuspendiert und unter Vermeidung von Blasenbildung in den zuvor

präparierten Tefzel-Schlauch injiziert. Der Schlauch wurde nachfolgend über 15 min hinweg in der „Tubing Prep Station“ rotiert, wodurch eine möglichst homogene Verteilung und Anlagerung der Mikrocarrier an die innere Oberfläche des Schlauches gewährleistet werden sollte. Die überschüssige Flüssigkeit wurde danach mit einer Spritze langsam wieder abgezogen und das Schlauchinnere unter fortgesetzter Rotation für 20 min mittels Stickstoffbegasung (s. o.) getrocknet. Zum Schluss wurde der Schlauch mit einem Schneidegerät (Tubing Cutter; Bio-Rad) in 13 mm lange Stücke geschnitten, welche als Patronen, wie exemplarisch in Abbildung 11 illustriert, in die Trommel der Helios™ Gene Gun (Bio-Rad) eingesetzt wurden. Bis zu ihrer Verwendung wurden die Patronen in braunen Polyethylen-Weithalsgefäßen (30 ml) bei 4 °C aufbewahrt.

Abb. 11: Darstellung einer mikrocarrierhaltigen Gene Gun-Patrone



Das voranstehende Foto zeigt stark vergrößert eines der 13 mm langen Tefzel®-Schlauchstücke, die als Gene Gun-Patronen dienten. Auf der Innenwand der Patrone sind die DiI-ummantelten Wolfram-Partikel, d. h. die Mikrocarrier („Bullets“), zu erkennen, die für die Zellmarkierung mittels Gene Gun in die Koronarschnitte geschossen wurden.

4.3.2 Die diolistische Fluoreszenzmarkierung

Vor der Freisetzung der Farbstoff-ummantelten Mikroträger aus den Patronen (vgl. Abb. 12c) war es zunächst erforderlich, einen Isopore™ Membranfilter aus Polycarbonat mit einer Porengröße von 3 µm und einer Porendichte von $8,0 \times 10^5$ Poren/cm² (MerckMillipore™, D) am Ende des Laufs bzw. Abstandhalters der Helios™ Gene Gun (Bio-Rad) einzusetzen, um zu verhindern, dass mögliche Mikrocarrier-Cluster in die jeweilige Probe (Koronarschnitte, 150 µm) katapultiert wurden (vgl. Abb. 12a + c). Der Filter wurde nach maximal 12 Schüssen erneuert. Die Abgabe der DiI-ummantelten Wolfram-Partikel („Bullets“) aus den Patronen erfolgte mittels Helium bei einem Gasdruck von 6 bar. Dazu wurde die Gene Gun, welche in Abbildung 12a + c zu sehen ist, über einen Schlauch am unteren Ende des Handgriffs mit der entsprechenden Hausgasleitung

verbunden. Wie anhand der Abbildung 12b nachvollziehbar ist, strömte das Gas in die Trommel (Patronenhalter) der Gene Gun bzw. in eine der Patronen, von denen maximal zwölf Stück in der Trommel Platz fanden. Durch die Helium-Druckwelle wurde ein Teil der in den Patronen befindlichen farbstoffhaltigen Mikroträger (s. o. Abb. 11) von der Innenwand der jeweiligen Patrone gelöst und zuerst in den Beschleunigungskanal, danach in den Lauf der Gene Gun befördert. Die O-Ringe auf jeder Seite der Trommel (vgl. Abb. 12b) dienten hierbei der korrekten Ausrichtung sowohl des Gaseinstroms in die Patrone als auch der Flugbahn der Mikroträger bei Verlassen der Patrone. Im Beschleunigungskanal des Geräts gewannen die Wolfram-Partikel an Geschwindigkeit, bevor sie sich im Lauf der Kanone ausbreiteten. Die zunehmende Querschnittsfläche des Laufs vom Beschleunigungskanal hin zum Abstandhalter (s. Abb. 12b) gewährleistete eine leichte Abschwächung des Heliumdrucks, so dass die Druckwelle etwas weniger intensiv auf die Probe traf, um Beschädigungen des Gewebes zu vermeiden. Der Abstandhalter (vgl. Abb. 12a-c) sorgte einerseits für die Einhaltung der optimalen Distanz zwischen Gene Gun und Hirnschnitt, andererseits erlaubte er die Gasabströmung weg von der Probe. Für diese nicht-toxische diolistische Fluoreszenzmarkierung der Neurone, welche sowohl auf der lipophilen Inkorporation des Carbocyanin-Farbstoffs Dil in die Zellmembranen als auch auf dessen Diffusion entlang der Membranen beruht, wurde jede Patrone einmal verwendet sowie jeder Hirnschnitt einmalig beschossen.

Nach dem Beschießen wurden die Hirnschnitte über Nacht bei Raumtemperatur in PBS aufbewahrt, am nächsten Tag für 30 min in 4 % Formaldehyd nachfixiert, in PBS gewaschen, einzeln auf Objektträger (25x75x1,0 mm; Thermo Scientific Superfrost® Plus, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, D) aufgezogen und in feuchtem Zustand mit 80 % Glycerin (in PBS; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D) unter Verwendung von geeigneten Deckgläsern (Gerhard Menzel GmbH, D) eingedeckt. Zum Abschluss wurden die Deckgläser mittels Klarlack (handelsüblicher klarer Nagellack) auf den Objektträgern fixiert und die Präparate für 1-2 Tage im Dunkeln bei Raumtemperatur getrocknet, bevor mit dem Mikroskopieren begonnen wurde. Die Nagellackbehandlung diente einerseits der luftdichten Versiegelung der Präparate, andererseits der Verhinderung von Bewegungen der Deckgläser während des Mikroskopierens mit Immersionsöl.

Die ballistische Fluoreszenzmarkierung der Koronarschnitte diverser Versuchstiere wurde verblindet vorgenommen.

Abb. 12a: Darstellung der für die diolistische Fluoreszenzmarkierung eingesetzten handgeführten Gene Gun



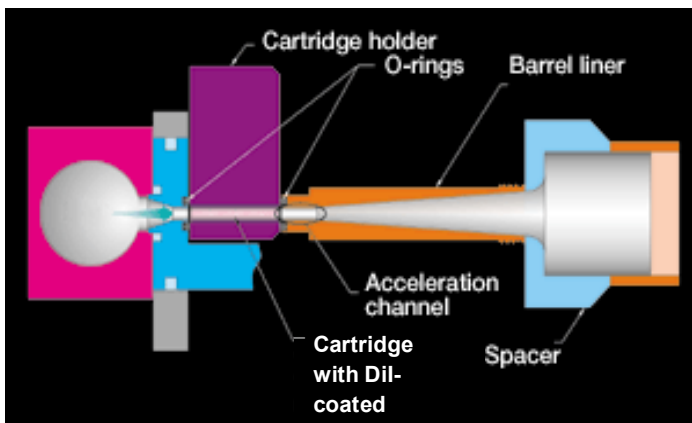
Für das Abfeuern der Dil-ummantelten Wolfram-Mikroträger wurde die Helios™ Gene Gun (Seriennummer: 297BR 2037) von Bio-Rad verwendet, deren Aussehen nebenstehende Abbildung 12a zeigt.

Patronenhalter (Trommel)

Abstandhalter der Gene Gun mit Membranfilter an dessen Ende

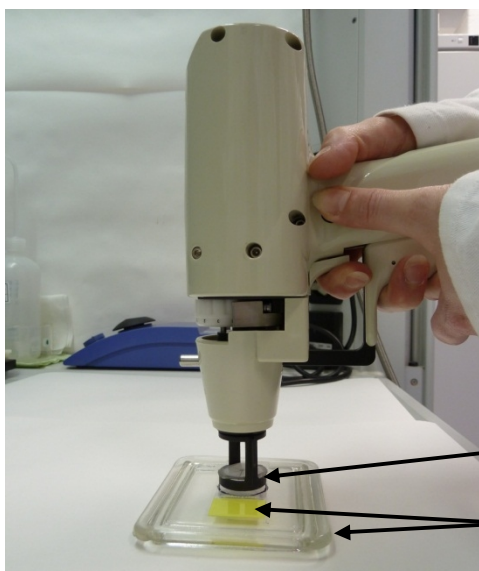
Die Befestigung des Schlauches für die Verbindung der Gene Gun mit der Heliumleitung erfolgte am unteren Ende des Handgriffs.

Abb. 12b: Schematischer Längsschnitt der Gene Gun



Darstellung mit freundlicher Genehmigung von Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D

Abb. 12c: Die Gene Gun im Einsatz während des „Schießens“



Das Foto 12c demonstriert die Handhabung der Gene Gun während des „Schießens“.

Auf dem Deckel einer Glasküvette war ein Objektträger fixiert, welcher als „Probentisch“ verwendet wurde. Auf diesen wurde der zu beschießende Koronarschnitt mit einem Pinsel transferiert.

Abstandhalter, unter dem sich die Probe befindet

„Probentisch bzw. -halter“

(Küvettedeckel mit darauf fixiertem Objektträger)

4.3.3 Die Anfertigung konfokaler Bildaufnahmen für die Spine-Analyse

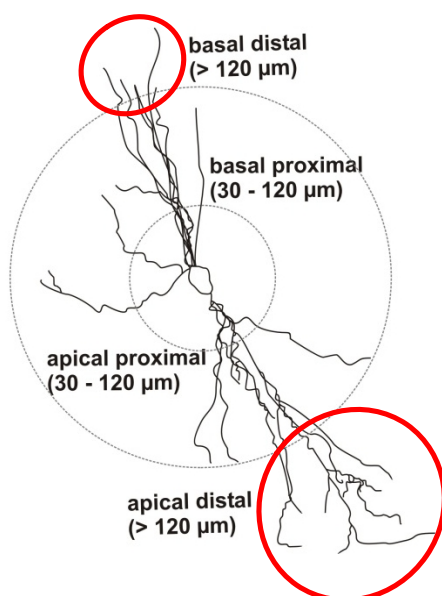
Nach der diolistischen Fluoreszenzmarkierung wurden für die spätere morphologische Analyse mit Hilfe eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops (LSM) Bildaufnahmen der Koronarschnitte angefertigt. An dieser Stelle muss darauf hingewiesen werden, dass zu Beginn der Dissertation das aufrechte LSM 510 Meta (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, D) in Kombination mit der ZEN-Software 2008 Version 5.0 (Carl Zeiss) zur Verfügung stand, während etwa ein Jahr später ein neues Modell, das aufrechte LSM 700 (Carl Zeiss), angeschafft und ab diesem Zeitpunkt in Verbindung mit der ZEN-Software 2010 Version 6.0 (Carl Zeiss) für die morphologischen Untersuchungen eingesetzt wurde. Dementsprechend wurden die mikroskopischen Bildaufnahmen im Rahmen der Methodenetablierung der Gene Gun mit dem LSM 510 angefertigt, alle weiteren Fotos wurden hingegen mit dem LSM 700 aufgenommen. Wie in Abbildung 14 schematisch dargestellt, erfolgte die quantitative und morphologische Untersuchung der synaptischen Dornfortsätze und damit auch die Aufnahme der konfokalen Bilder in Abhängigkeit von der jeweiligen Studie im mPFC bzw. dessen Subregionen Cg1, PrL und IL (Abb. 14, A), im dorsalen Bereich des Striatums (CPu, caudate putamen = Nukleus caudatus + Putamen; B), im NAcc (C), differenziert nach Kern- (core) und Schalenregion (shell) sowie in der dorsalen CA1-Region des Hippokampus (D), wobei hier zwischen basalen und apikalen Bereichen unterschieden wurde. Für die Fluorochromierung wurde generell, d. h. sowohl für die Spine-Evaluation als auch für die Sholl-Analyse (vgl. Abschnitt 4.3.5), der Carbocyanin-Farbstoff Dil (1,1'-Diocetyl-3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanin-perchlorat) verwendet, dessen Fluoreszenz-Anregungs- und -Emissionsmaximum bei 549 nm bzw. bei 565 nm liegt (O'BRIEN & LUMMIS, 2006). Für die Anregung diente ein Helium-Neon-Laser mit einer Wellenlänge von 543 nm (LSM 510) bzw. ein stabiler Festkörperlaser mit einer Wellenlänge von 555 nm (LSM 700). Zunächst war es erforderlich, die individuelle Qualität der Markierung für jeden Hirnschnitt zu beurteilen sowie geeignete Zellen bzw. Dendritenabschnitte zu selektieren. Um sich den gewünschten Gesamtüberblick verschaffen zu können, wurde dieser Arbeitsschritt bei geringer Vergrößerung durchgeführt. Das LSM 510 betreffend wurde dafür das 16x Objektiv (Plan-Neofluar 16x/0,50) mit Immersionsöl verwendet, in Bezug auf das LSM 700 wurde ausstattungsbedingt das 10x Objektiv (EC Plan-Neofluar 10x/0,30 M27) genutzt. Für jedes zu evaluierende Gehirnnareal mussten die Zellen des Interesses, beispielsweise die Pyramidenzellen der hippokampalen CA1-Region, auf der Basis ihrer Morphologie identifiziert und von anderen ebenfalls markierten Zelltypen, u. a. Interneurone,

differenziert werden. Nach der Selektion eines adäquaten, intensiv und homogen fluoreszierenden Neurons mussten für eine erfolgreiche Spine-Analyse weiterhin verschiedene Kriterien hinsichtlich der Auswahl der dendritischen Segmente erfüllt werden. Aufgrund der Tatsache, dass sich die unterschiedlichen Bereiche der Dendritenbäume durch differente Spinedichten auszeichnen und proximale Dendritensegmente physiologisch weniger Dornfortsätze besitzen als distale Abschnitte (FIALA et al., 2008; MEGIAS et al., 2001), wurden für die Spine-Evaluation ausschließlich distale Dendritenabschnitte zugrunde gelegt. Daher mussten die gewählten Teilstücke der Zellausläufer eine Distanz von mindestens 120 μm zum Soma aufweisen (vgl. Abb. 13). Um die spätere Identifizierung der synaptischen Dornfortsätze zu gewährleisten, sollte sich das entsprechende dendritische Segment möglichst isoliert, d. h. ohne Überlappungen mit benachbarten Zellfortsätzen, erstrecken. Darüber hinaus wurde angestrebt, vorrangig solche Dendriten zu selektieren, die möglichst gerade verliefen, was bedeutet, dass sich deren Auswuchs in der z-Ebene idealerweise auf wenige optische Schnitte beschränkte. Nachdem ein die zuvor genannten Charakteristika erfüllendes, mindestens 10 μm langes dendritisches Segment bestimmt worden war, war es nötig, dessen Tiefenausdehnung in der z-Ebene zu ermitteln. Die Vergrößerung wurde in Kombination mit Immersionsöl auf 2772-fach (LSM 510 \rightarrow Plan-Apochromat 63x/1,4 Öl-Objektiv, 10x Okular, 4,4 Zoomfaktor) bzw. 1953-fach (LSM 700 \rightarrow Plan-Apochromat 63x/1,40 Öl DIC M27-Objektiv, 10x Okular, 3,1 Zoomfaktor) erhöht und sobald der ausgewählte Dendrit beim Fokussieren sichtbar wurde, wurde diese Fokusebene mit Hilfe der in der ZEN-Software enthaltenen Werkzeuge als erster optischer Schnitt definiert. Analog dazu wurde diejenige Fokusebene, die die Umrisse des Dendriten gerade noch erkennen ließ, als letzter optischer Schnitt festgelegt. Das Intervall zwischen den einzelnen Schnitten eines sogenannten z-Stapels (z-stack) war stets gleichbleibend auf 0,1 μm eingestellt; die Skalierung auf der x- und y-Achse betrug jeweils 0,064 μm . Um diese Einstellung für beide Mikroskope zu gewährleisten, musste ein Zoomfaktor von 4,4 für das LSM 510 bzw. von 3,1 für das LSM 700 gewählt werden. Anschließend erfolgte das linienförmige, dreidimensionale Scannen des Objekts, also die Erzeugung eines 3D-Bildstapels, mit einer Pixelverweildauer (pixel dwell time) von 1,60 μs (LSM 510) bzw. 1,58 μs (LSM 700) und einer Laserleistung von 85,2 % (LSM 510) bzw. 1 % (LSM 700). Um das Signal-Rausch-Verhältnis möglichst optimal zu halten, wurde für den Durchmesser der Lochblende (pinhole) eine Airy Unit (1 AU) gewählt, was einem Durchmesser von 106 μm (LSM 510) bzw. von 34 μm (LSM 700) entsprach. Die Auswahl von 1 AU bestimmte dabei

den Durchmesser der Detektionslochblende des LSM. Von einer ursprünglichen Rahmengröße von 512 x 512 Pixel ausgehend konnte die finale Größe der 8 bit-Bilder durch individuelles „Zuschneiden“ der y-Achse innerhalb des ZEN-Programms variieren. Auch die Regulierung von Belichtung und Kontrast konnte anhand der Software-Instrumente bildspezifisch vorgenommen werden. Bestenfalls wurde nur ein Dendritensegment, in der Regel aber nicht mehr als zwei Abschnitte je Neuron gescannt. In Abhängigkeit von der jeweiligen Studie wurden für jedes Tier und jede Gehirnregion sowie gegebenenfalls pro Hirnhemisphäre fünf oder zehn dendritische Segmente mit einer jeweiligen Länge von mindestens 10 μm für die Spine-Analyse aufgenommen. Die sich daraus ergebenden fünf bzw. zehn Einzelwerte wurden für die statistische Auswertung gemittelt. Sämtliche Bildaufnahmen am LSM sowie deren Analyse wurden verblindet durchgeführt.

Da die vorliegende Dissertation u. a. die Entwicklung und Etablierung eines automatisierten 3D-Spine-Analyse-Moduls innerhalb der Software Definiens Architect XD beinhaltete, stellen die dafür erforderlichen Arbeitsschritte nicht nur methodische Verfahren dar, sondern sind vielmehr als grundlegende Ergebnisse zu verstehen. Aus diesem Grund werden die manuelle sowie die Software-gesteuerte zuerst 2D-, dann 3D-Spine-Analyse im Ergebnissteil in den Abschnitten 5.2 und 5.3 detailliert erläutert.

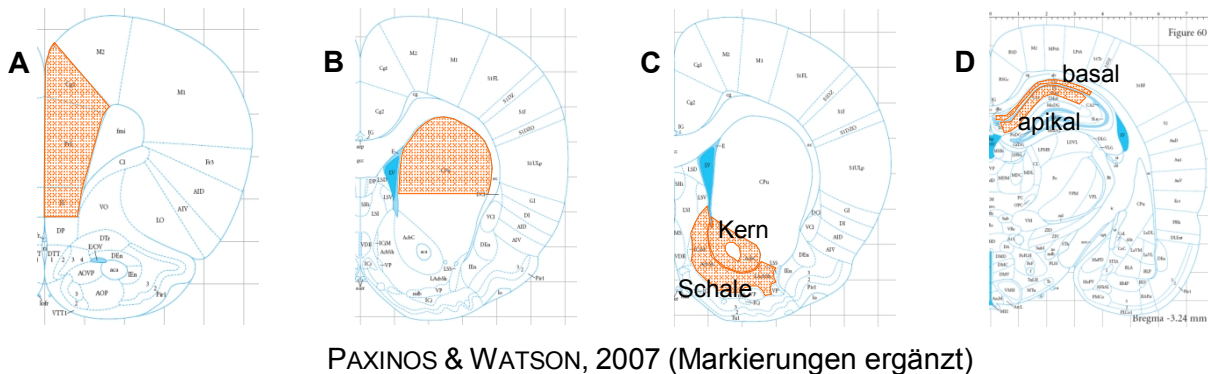
Abb. 13: Skizze eines Pyramidenneurons mit den verschiedenen Dendritbereichen



PEREZ-CRUZ et al., 2011 (Markierungen ergänzt)

Die voranstehend skizzierte Morphologie einer Pyramidenzelle veranschaulicht die Bezeichnungen der verschiedenen Dendritbereiche bezogen auf deren Distanz [μm] zum Soma. Die rot umrandeten distalen Segmente mit einer Entfernung von 120 μm oder mehr zum Zellkörper waren diejenigen, die für die Spine-Analyse der Dendriten präfrontaler und hippocampaler Pyramidenneurone sowie striataler und accumbaler „medium spiny neurons“ (mittelgroße, bedornete Neurone) zugrunde gelegt wurden (s. auch Abb. 14).

Abb. 14: Schematische Darstellung der für die Spine- und Sholl-Analyse evaluierten Gehirnareale



Die schematischen Koronarschnitte A-D demonstrieren, in welchen Gehirnarealen studienabhängig dendritische Segmente für die quantitative und morphologische Untersuchung der synaptischen Dornfortsätze mit Hilfe des LSM fotografiert wurden. A: medialer präfrontaler Kortex (mPFC), zusammengesetzt aus Cg1, PrL und IL. B: dorsaler Bereich des Striatums (CPu, caudate putamen). C: Nukleus accumbens (NAcc), differenziert nach Kern- (core) und Schalenregion (shell). D: dorsale hippocampale CA1-Region, differenziert nach basalen und apikalen Dendriten.

Neben den distalen Dendritenabschnitten für die Spine-Evaluation wurden im mPFC (A) sowie in CA1 (D) außerdem vollständige Pyramidenzellen für die Sholl-Analyse (s. u.) am LSM aufgenommen.

4.3.4 Die Anfertigung konfokaler Bildaufnahmen für die Sholl-Analyse

In Bezug auf die Auswahl der Pyramidenzellen des mPFC sowie der CA1-Region für die Sholl-Analyse (vgl. Abb. 15) waren ähnliche Faktoren zu berücksichtigen wie die zuvor genannten. Nach der eindeutigen Identifizierung von Pyramidenzellen beider Hirnregionen galt es, diejenigen Neurone auszuwählen, die sich zum einen durch eine intensive, einheitliche und vollständige Dil-Markierung, zum anderen durch das Vorhandensein von bestenfalls mindestens je drei basalen und apikalen Dendriten auszeichneten. Es war ferner wünschenswert, dass das dendritische Verzweigungsmuster eines jeden Zellfortsatzes wenigstens die zweite, besser die dritte hierarchische Ordnung erreichte. Um die spätere Rekonstruktion des Neurons sicherzustellen, war es nötig, auch für die Sholl-Analyse möglichst isoliert gelegene Zellen zu detektieren, deren Ausläufer idealerweise keine Überkreuzungen oder Überlagerungen mit anderen Zellfortsätzen

aufwiesen. Um die jeweilige Pyramidenzelle bzw. deren Morphologie vollständig erfassen zu können, wurde beim Mikroskopieren und Scannen der selektierten Neurone ausschließlich das 10x Objektiv (EC Plan-Neofluar 10x/0,30 M27) verwendet; alle Bilder wurden am LSM 700 150-fach vergrößert (10x Objektiv, 10x Okular, 1,5 Zoomfaktor) aufgenommen. Auch hier war es erforderlich, die Tiefenausdehnung der Zelle in der z-Ebene anhand des oben beschriebenen Fokussierens entlang der z-Achse zu bestimmen. Der Abstand zwischen zwei optischen Schnitten betrug dabei konstant 6,0 μm ; x- und y-Achse waren jeweils mit 0,834 μm skaliert. Die Pixelverweildauer (1,58 μs), die Laserleistung (1 %) sowie der Lochblendendurchmesser (34 μm , 1 AU) stimmten mit den Werten für das Scannen einzelner Dendritensegmente für die Spine-Analyse überein (vgl. o.). Im Rahmen des MAM-Versuchs wurden in CA1 3 - 5, in CA2 2 - 4 und in CA3 2 Neurone je Tier für die Sholl-Analyse (s. u.) aufgenommen, bezüglich der Poly I:C-Studie waren es 2 - 4 kortikale (mPFC) sowie 2 - 4 hippocampale (CA1) Pyramidenneurone je Versuchstier. Aus den daraus resultierenden Einzelwerten wurde für die Statistik der jeweilige Mittelwert gebildet. Sämtliche Bildaufnahmen am LSM sowie deren Analyse wurden verblindet durchgeführt.

4.3.5 Die Sholl-Analyse

Die Sholl-Analyse dient der Repräsentation der Gesamt-Morphologie einer Zelle und somit der Evaluation der Zellkomplexität. In der vorliegenden Dissertation wurde diese Analyse für zwei präklinische Nagermodelle der Schizophrenie zur Beurteilung der dendritischen Komplexität durchgeführt - für das MAM- und das Poly I:C-Modell. Die Auswertung, für welche die Analyse-Software Neurolucida (MBF Bioscience) in Kombination mit dem Neurolucida-Explorer (MBF Bioscience) verwendet wurde, beruht darauf, mit Hilfe der in dem Computerprogramm vorhandenen Werkzeuge die Zelle bzw. deren dendritisches Verzweigungsmuster dreidimensional zu rekonstruieren. Zu diesem Zweck wurde in den zugrunde liegenden konfokalen 8 bit-Bildaufnahmen (vgl. Abb. 16A) zuerst das Perikaryon der Zelle identifiziert und konturiert und anschließend sämtliche neuronale Fortsätze verfolgt und nachgezeichnet (s. Abb. 16B). Bei diesem Prozess war es essentiell, durch die z-Achse zu fokussieren, um die Informationen aller optischen Schnitte bzw. die morphologische Ausdehnung des Neurons in der Tiefe korrekt zu erfassen (vgl. Abb. 16, A + B). Während der linienförmigen Abbildung der Dendritenbäume mussten zusätzlich die dendritischen Endigungen, d. h. die Endpunkte eines jeden Zellausläufers, sowie deren

Verzweigungspunkte ermittelt und gekennzeichnet werden. Bei den Verzweigungen handelte es sich im Wesentlichen um Knotenpunkte, aus denen zwei oder drei, selten vier, weiterführende Dendritenäste hervorgingen („bi-, trifurcating node“). Die einzelnen, dem Perikaryon entspringenden dendritischen Bäume wurden mittels individueller Farbzweisung differenziert (s. Abb. 16B). Ein weiteres Charakteristikum der Sholl-Analyse sind die verschachtelten konzentrischen Kreise, die ausgehend vom Perikaryon (Zentrum des Perikaryons = 0) mit konstantem Radius (hier: 10 μm) automatisch um die zu untersuchende Zelle gelegt werden, wie in Abbildung 15 schematisch dargestellt. Um Rückschlüsse auf die Komplexität der jeweiligen Zelle ziehen zu können, wurden einerseits die Schnittpunkte, an denen die Zellausläufer die virtuellen Kreise in unterschiedlicher Distanz zum Soma kreuzen (vgl. Abb. 15), sowie die hierarchischen Ordnungen der Dendriten bestimmt, andererseits wurden u. a. die dendritische Länge [μm] und die Quantitäten der vorhandenen Dendriten wie auch die der Endpunkte Software-gesteuert gemessen. Sowohl die graphische Darstellung des rekonstruierten Neurons (s. Abb. 16B) als auch die tabellarische Zusammenfassung der Daten der gewählten Analyse-Parameter erfolgten mittels des Neurolucida-Explorer-Programms. Von dort konnten die Zahlenwerte manuell in Excel übertragen und für die Statistik zusammengestellt werden.

Abb. 15: Schematische Darstellung einer Pyramidenzelle mit den sie umgebenden konzentrischen Kreisen der Sholl-Analyse

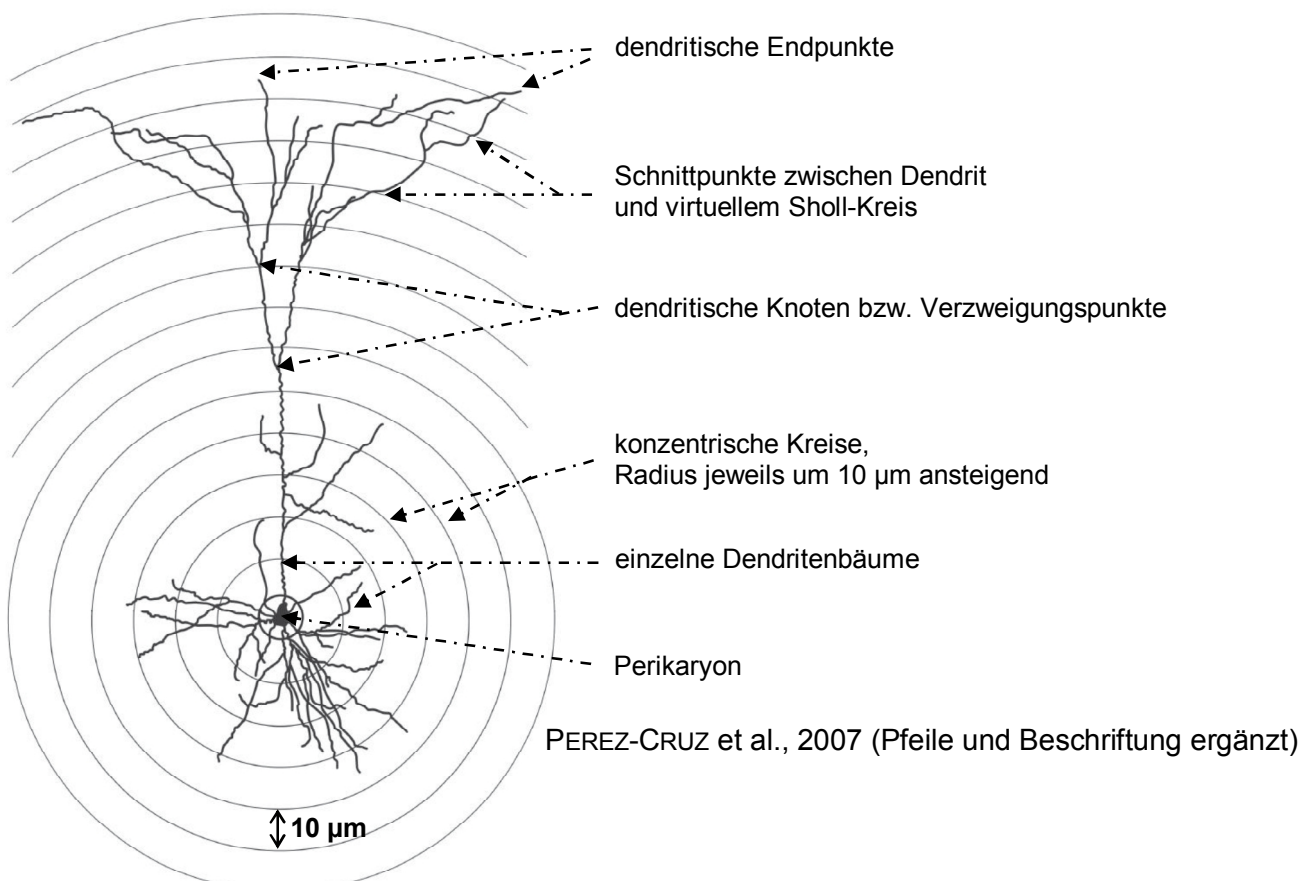
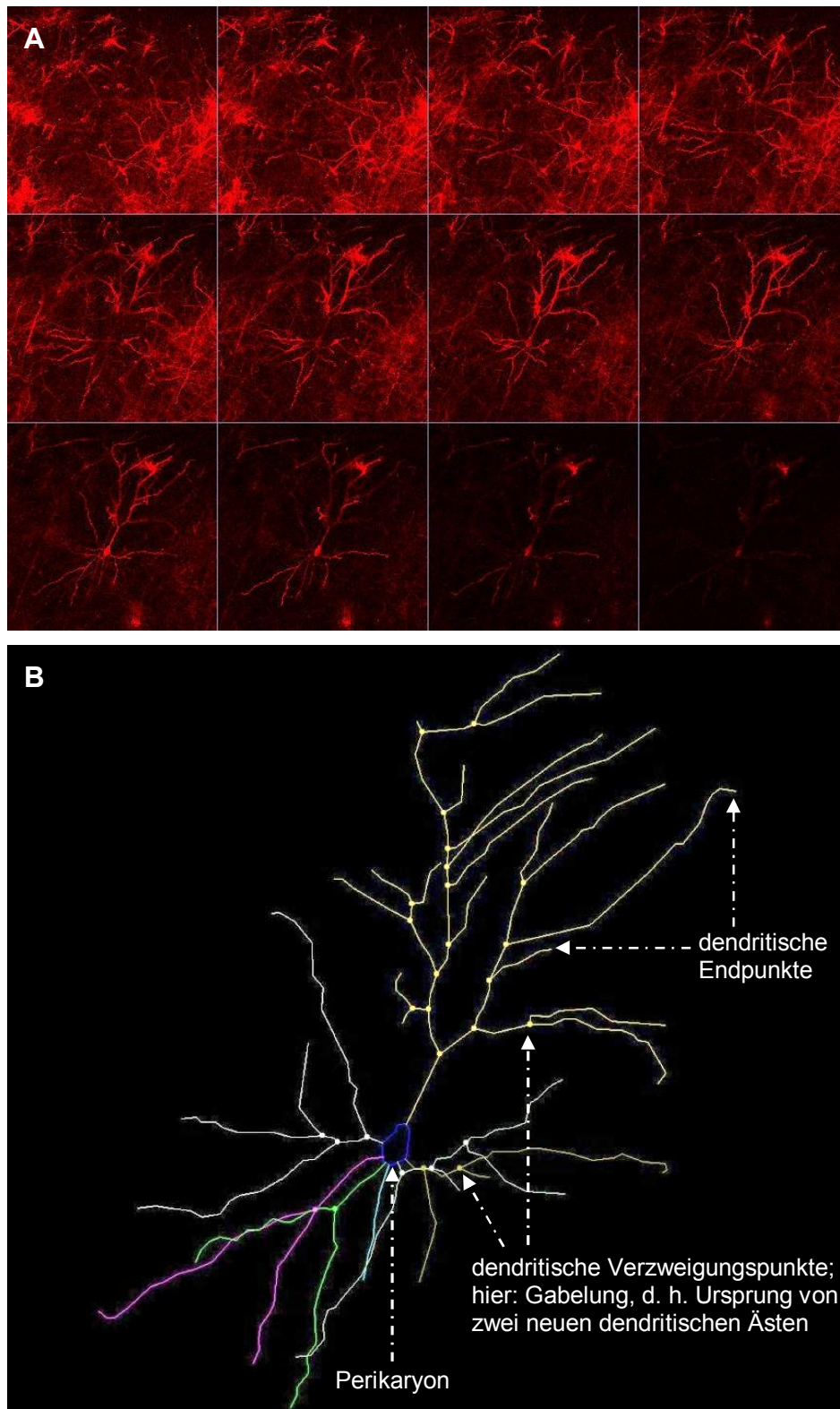


Abb. 16: Exemplarische Demonstration einer Sholl-analysierten kortikalen Pyramidenzelle (mPFC)



A: Galerieansicht einer Pyramidenzelle des medialen präfrontalen Kortex (mPFC) innerhalb der ZEN-Software, die die einzelnen optischen Schnitte (hier: 12) mit einem Intervall von 6,0 μm entlang der z-Achse repräsentiert **B:** Erscheinungsbild derselben kortikalen Pyramidenzelle innerhalb des Neurolucida-Explorer-Programms nach deren Rekonstruktion auf Basis der Sholl-Analyse.

4.4 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde die Computer-Software GraphPad Prism Versionen 5.03 und 6.01 (GraphPad Software, Inc., USA) verwendet. Die Auswahl des geeigneten statistischen Tests richtete sich nach den Anzahlen der untersuchten Versuchstiergruppen sowie der Faktoren, die den auszuwertenden Parameter beeinflussten. Im Falle von zwei zu evaluierenden Tiergruppen basierte die Untersuchung auf signifikante Unterschiede auf dem ungepaarten, zweiseitigen t-Test. Lagen hingegen drei zu analysierende Einheiten vor, wurde für deren Vergleich eine einfaktorielle Varianzanalyse (One-way ANOVA, engl. Analysis of Variance) herangezogen. Zur Post-hoc-Beurteilung wurde dabei Tukey's Test für multiple Vergleiche angewendet. Des Weiteren wurden die Resultate der immunologischen Induktion Schizophrenie-typischer Symptome mittels pränataler Poly I:C-Exposition anhand einer zweifaktoriellen Varianzanalyse beurteilt, da in dieser Studie zwei Faktoren auf die Effekte einwirken konnten - zum einen die pränatale Poly I:C- bzw. Vehikel-Exposition (als „Modell“ bezeichnet), zum anderen die postnatale Risperidon- bzw. Vehikel-Applikation (als „Behandlung“ deklariert). In diesem Zusammenhang wurden die beiden Einflussfaktoren auch auf eine mögliche Interaktion überprüft, um zu beurteilen, ob der durchschnittliche Behandlungseffekt unabhängig vom Modell und demnach für die zwei möglichen pränatal verabreichten Substanzen identisch war. Der Post-hoc-Analyse dienten dabei die multiplen Vergleiche gemäß Bonferroni. Sämtliche Resultate der Statistik wurden als Mittelwerte mit dem dazugehörigen Standardfehler des Mittelwerts (engl. standard error of the mean, SEM) angegeben.

Ferner wurde zur Verifizierung der Konformität zwischen Software-basierter 2D- und manueller 3D-Auswertung der synaptischen Dornfortsätze die parametrische Korrelationsanalyse nach Pearson durchgeführt. Nach der Weiterentwicklung der Definiens Architect XD-Software wurde diese Korrelationsanalyse erneut zur Überprüfung eines linearen Zusammenhangs zwischen automatisierter 2D- und 3D-Spine-Evaluation vorgenommen. Die entsprechenden Testresultate sind als Korrelationskoeffizienten (r) aufgeführt und können Werte zwischen +1 und -1 einnehmen. Je näher der Koeffizient an +1 bzw. -1 liegt, desto stärker ist die positive bzw. negative Korrelation zwischen den untersuchten Daten, während $r = 0$ darauf hindeutet, dass zwischen den eruierten Parametern kein linearer Zusammenhang vorliegt, d. h. diese völlig unabhängig voneinander sind. Für alle statistischen Tests wurde ein Signifikanzniveau (p) von 5 % zugrunde gelegt. Demnach galten p -Werte kleiner/gleich 0,05 als statistisch signifikant bzw. größer/gleich 0,05 als statistisch nicht signifikant (n. s.).

4.5 Aufstellung der für sämtliche Methoden benötigten Materialien, Substanzen und Geräte sowie der verwendeten Computerprogramme

Die nachfolgend tabellierten Materialien etc. sind der Chronologie entsprechend aufgelistet und im Falle einer mehrfachen Verwendung nur einmal angegeben.

Materialien, Substanzen, Geräte, Software	Hersteller
Open Field-Test	
Open Field-Arenen (Polyethylen)	Elgema Kunststoffverarbeitung GmbH, Dannstadt-Schauernheim, D
Tracking-Software Noldus EthoVision 3.1.16	Noldus InformationTechnology, Wageningen, NL
Videokamera Santec VTC-642DNP	Sanyo Video Vertrieb AG, Ahrensburg, D
0,01 M phosphatgepufferte 0,9 % Kochsalzlösung (PBS 10x, pH-Wert 7,6)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
gereinigtes Wasser (Milli-Q ^R Gradient)	MerckMillipore GmbH Schwalbach/Ts., D
d-Amphetaminsulfat (Lot 90K3354)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
(-)-Quinpirolhydrochlorid (Batch 6B/55633)	Tocris Bioscience, Bristol, UK
physiologische Kochsalzlösung (0,9 % Natriumchlorid)	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H., D
Kanüle Nr. 16 (0,6 x 25 mm, 23G x 1")	Terumo Europe N.V., Leuven, B
1 ml Spritze Soft-Ject®	Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen, D
mikrozid® AF Jumbo Tücher	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, D
Zellstofftücher	
Gehirnpräparation	
Ketaminhydrochlorid (10 %)	CP-Pharma GmbH, Burgdorf, D
Rompun® (Xylazinhydrochlorid 2 %)	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, D
Sevorane® (Sevofluran)	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, D
Formaldehyd (38 %)	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, NL
Saccharose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Perfusionswanne, Perfusionsnadel, Scheren, Bulldogklemme, Pinzette, Knochenzange, Pflasterstreifen, Zellstofftücher	
Histologie	
6-, 12-, 24-Well-Platten (Zellkulturplatten)	Corning Inc., Corning, New York, USA
Gefriermikrotom Reichert-Jung 1206 mit Kühlaggregat Frigomobil	Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, D
Tissue-Tek®	Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, NL
Vibratom Leica VT1000S	Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, D
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂ 30 %)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Methanol (100 %)	Merck KGaA, Darmstadt, D

4. Material und Methoden

Materialien, Substanzen, Geräte, Software	Hersteller
Histologie - Fortsetzung	
Ethanol (100 %)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBST) mit Tween20 (10x)	Dako North America, Inc., Carpinteria, Kalifornien, USA
Anti-Parvalbumin-Antikörper MAB1572 MsxParvalbumin	Millipore, Temecula, Kalifornien, USA
Biotinylierter Sekundär-Antikörper Biotin-SP-conjugated Affini Pure Donkey Anti-Mouse IgG (H + L)	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, Pennsylvania, USA
Eselserum	Bio-Rad AbD Serotec GmbH, Puchheim, D
ABC-Kit PK-6100 Vectastain® Elite	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Kalifornien, USA
Peroxidase Substrat-Kit SK-4100 DAB	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Kalifornien, USA
Thermo Scientific Superfrost® Plus Gold Objektträger (25 x 75 x 1,0 mm)	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, D
Deckgläser (22 x 50 mm)	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, D
X-TRA-Solv®	Medite GmbH, Burgdorf, D
UltraKitt	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, NL
Sekundenkleber, Skalpell, Feinhaarpinsel	
Diolistische Zellmarkierung	
Tefzel®-Schlauch	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Tubing Prep Station	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Polyvinylpyrrolidon	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
1,1'-Diocadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyaninperchlorat	Invitrogen™, Eugene, Oregon, USA
Dichlormethan	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, NL
Wolfram-Partikel (Ø 1,3 µm)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Greiner-Röhrchen Cellstar®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Ultraschallbad USC200TH	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Tubing Cutter	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Helios™ Gene Gun	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Polyethylen-Weithalsgefäßen 30 ml	VWR International Belgium bvba, Leuven, B
Isopore™ Membranfilter	MerckMillipore™, Schwalbach/Ts., D
Glycerin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Thermo Scientific Superfrost® Plus Objektträger (25 x 75 x 1,0 mm)	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, D
Deckgläser (22 x 22 mm)	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, D
Stickstoff, Helium, Spritze, Rasierklinge, Glasplatte, Feinhaarpinsel, Tupfer, klarer Nagellack	

4. Material und Methoden

Materialien, Substanzen, Geräte, Software	Hersteller
Visualisierung der Morphologie	
Mirax Scan	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, D
Image-Pro Plus® 5.0.0.39	Media Cybernetics Inc., Rockville, Maryland, USA
Laser Scanning Mikroskop 510 Meta Laser Scanning Mikroskop 700	Carl Zeiss, MicroImaging GmbH, Göttingen, D
ZEN 2008 Version 5.0 ZEN 2010 Version 6.0	Carl Zeiss, MicroImaging GmbH, Göttingen, D
Immersol™ 518F	Carl Zeiss Jena GmbH, Oberkochen, D
AxioVision 4.8.2.0	Carl Zeiss, MicroImaging GmbH, Göttingen, D
Neurolucida® 7.53.3 Neurolucida-Explorer 4.60.1	MBF Bioscience, Williston, Vermont, USA
Definiens Architect XD	Definiens AG, München, D
Statistik	
GraphPad Prism Versionen 5.03 und 6.01	GraphPad Software, Inc, La Jolla, Kalifornien, USA

5. Ergebnisse

5.1 Vergleich der konfokalen Laser Scanning Mikroskope LSM 510 Meta und LSM 700 (Carl Zeiss)

Wie im Methodenteil unter Punkt 4.3.3 erwähnt, wurde zu Beginn der Dissertation, d. h. für die Methodenetablierung der Gene Gun, das aufrechte LSM 510 Meta verwendet (vgl. Abb. 17A). Die konfokalen Aufnahmen zur neuroanatomischen Charakterisierung präklinischer Schizophrenie-Modelle wurden hingegen mit Hilfe des neueren Modells LSM 700 (s. Abb. 17B) angefertigt. Die Fotos folgender Abbildung 17 verdeutlichen den Unterschied in der Qualität der konfokalen Bilder in Abhängigkeit vom eingesetzten Mikroskop.

Abb. 17: Vergleich der Bildqualität konfokaler LSM-Fotos

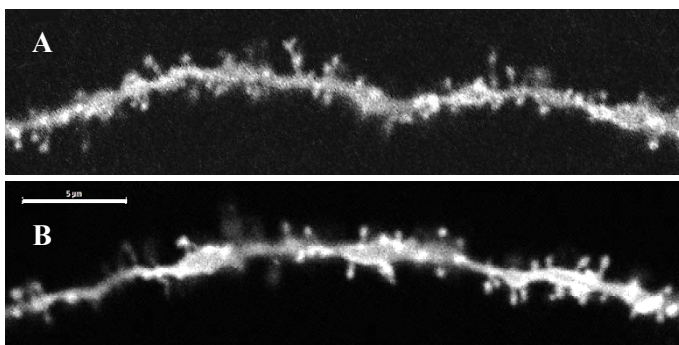


Foto A wurde mit dem LSM 510 Meta aufgenommen, Foto B hingegen mit dem LSM 700. Aus dem Vergleich der Bilder ist ersichtlich, dass durch den Einsatz des neueren Mikroskops die Bildqualität optimiert wurde. So ist die Aufnahme B gegenüber A klarer und die Abgrenzung zwischen Objekt und Hintergrund eindeutiger. Maßstab: 5 µm.

Die Fotos A + B voranstehender Abbildung 17 zeigen das Original-LSM-Bilder in der Definiens Analyse-Software, wobei Foto A mit dem LSM 510, Foto B mit dem LSM 700 aufgenommen wurde. Beim Vergleich der Aufnahmen fällt auf, dass mit Hilfe des neueren LSM 700 Fotos erzeugt wurden, die sich durch ein deutlich besseres Signal-Rausch-Verhältnis auszeichneten. Die Grenze zwischen dem Objekt, d. h. dem Dendrit bzw. den darauf lokalisierten Dornfortsätzen, und dem Hintergrund ist wesentlich schärfer als auf dem mit dem LSM 510 aufgenommenen Foto A, welches etwas „verrauscht“ bzw. „pixelig“ erscheint. Auf der Basis der konfokalen Bilder, die mit dem LSM 700 aufgenommen wurden, konnte demnach die Segmentierung, d. h. die Differenzierung zwischen Objekt und Hintergrund, und somit letztlich die Detektion der dendritischen Spines leichter

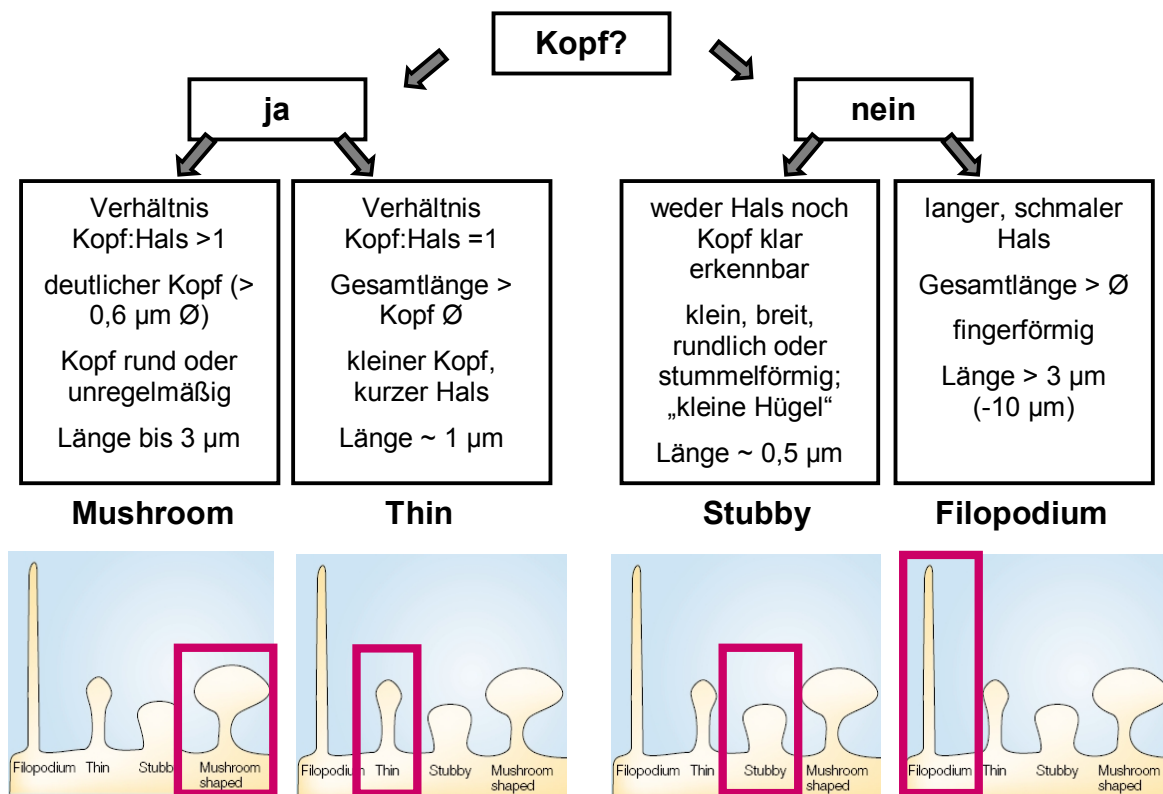
vorgenommen werden. Die rein Mikroskop-bedingte Optimierung der Bildqualität wurde zudem vom Gebrauch einer signifikant geringeren Laserleistung begleitet - 1 % (LSM 700) versus 85,2 % (LSM 510) -, was wiederum in einem schwächeren Ausbleichen und somit in einem besseren Kontrast und einem längeren Erhalt der fluoreszenzmarkierten Hirnschnitte resultierte.

5.2 Quantitative und morphologische Analyse synaptischer Dornfortsätze

Um das Ziel dieser Dissertation - die automatisierte quantitative und morphologische Untersuchung synaptischer Dornfortsätze in verschiedenen präklinischen Tiermodellen - zu erreichen, wurde einerseits die in Abschnitt 4.3.2 (Material und Methoden) erläuterte diolistische Fluoreszenzmarkierung zur Visualisierung der Spines validiert sowie andererseits auf Basis eines Spine-Analyse-spezifischen Moduls (Definiens Architect XD-Software) zuerst die Software-gesteuerte 2D-, dann die 3D-Spine-Analyse schrittweise entwickelt und etabliert. Die Verifizierung und Etablierung des Markierungs- und 3D-Spine-Analyseverfahrens sind daher nicht nur als wesentliche methodische Bestandteile der vorliegenden Arbeit zu verstehen, sondern gleichzeitig als zentrale Ergebnisse anzusehen. Aus diesem Grund sowie zur Verdeutlichung der inhaltlichen Relevanz dieser Arbeitsschritte für die vorliegende Arbeit wird das Vorgehen von der manuellen Spine-Auswertung bis hin zur finalen Etablierung der automatisierten 3D-Spine-Analyse hier in den nächsten Abschnitten der Ergebnisse dargestellt.

5.2.1 Morphologische Klassifikation synaptischer Dornfortsätze

Um die synaptischen Dornfortsätze gemäß ihrer Morphologie und Größe in verschiedene Subtypen zu klassifizieren, wurden auf der Grundlage stichprobenhafter Vermessungen der Spines sowie in Anlehnung an die Literatur (SORRA & HARRIS, 2000; TACKENBERG et al., 2009) Differenzierungskriterien definiert. Die für die vier ausgewerteten Spine-Klassen jeweils charakteristischen Merkmale, welche außerdem die Basis der Parametereinstellungen für das Spine-Klassifikationsmodul als Bestandteil der mit der Definiens Developer XD-Software (s. u.) selbst entwickelten automatisierten Spine-Analyse bildeten, sind in dem folgenden Diagramm zusammengefasst.

Abb. 18: Die Klassifikationsparameter der vier untersuchten Spine-Subtypen

HERING & SHENG, 2001 (Markierungen ergänzt)

5.2.2 Die manuelle 3D-Spine-Analyse

Die manuelle dreidimensionale Quantifizierung und Klassifizierung der synaptischen Dornfortsätze distaler Dendritensegmente wurde unter Zuhilfenahme der Analyse-Software Neurolucida® Version 7.53.3 in Kombination mit dem Neurolucida-Explorer Version 4.60.1 (beides MBF Bioscience, USA) durchgeführt. Um automatisch die Länge des jeweiligen Dendritensegments bestimmen zu können, war es zuerst erforderlich, den Dendrit mit Hilfe der Software-Werkzeuge nachzuzeichnen. Hierbei mussten alle optischen Schnitte des z-Stapels berücksichtigt werden, weshalb während der Rekonstruktion durch die z-Ebene fokussiert wurde. Anschließend wurden die morphologischen Spine-Subtypen Mushroom, Thin, Stubby und Filopodia (s. o. Abb. 5 und 18) durch das Markieren mit unterschiedlichen Symbolen in der Neurolucida-Analysesoftware erfasst und differenziert. Die synaptischen Dornfortsätze, die sich wegen ihrer ungewöhnlichen Morphologie keiner der vier Spine-Subtypen zuweisen ließen, wurden als Klasse „undefined“ in die Gesamtzahl der Spines einbezogen. Nach Abschluss der Spine-Klassifikation konnte das bearbeitete Foto gespeichert und anschließend im Neurolucida-Explorer geöffnet werden,

um hier eine tabellierte Zusammenstellung der ermittelten Dendritenlänge in μm sowie der Spine-Quantitäten insgesamt bzw. pro Spine-Klasse zu erhalten und diese Daten letztlich manuell in Excel zu übertragen. Dort wurden einerseits aus den Einzelwerten, welche aus der Analyse der einzelnen Messungen pro Tier resultierten, die Mittelwerte für jedes Tier gebildet, andererseits wurden für die Statistik die Spine-Zahlen pro μm berechnet.

5.2.3 Die automatische Spine-Analyse mittels Definiens Architect XD-Software

Die automatisierte Quantifizierung und Klassifizierung der dendritischen Spines wurde unter Einsatz eines selbst entwickelten Spine-Analyse-Moduls innerhalb der Software Definiens Architect XD (Definiens AG, D) durchgeführt. Die schrittweise Mitentwicklung und Etablierung dieses Spine-Analyse-Moduls waren wesentliche Bestandteile der vorliegenden Dissertation und sollen daher im Folgenden detailliert aufgezeigt werden. Zunächst wird auf die automatisierte 2D-Auswertung der Dornfortsätze eingegangen. Bei diesem Ansatz fand nur eine Software-gesteuerte Erfassung der Gesamt-Spinezahlen statt. Darauf aufbauend wurde ein 3D-Algorithmus entwickelt, der neben einer Quantifizierung der Spines in 3D, außerdem eine Klassifizierung dieser erlaubte. Die Entwicklung des Spine-Analyse-Moduls erfolgte in enger Kooperation mit einem Software-Spezialisten (M. Maasland, Fraunhofer ITWM, Kaiserslautern, D) der auch für die Programmierung der Algorithmen innerhalb der Definiens-Software verantwortlich war.

Im Fall der zweidimensionalen Software-gestützten Spine-Auswertung mussten die am konfokalen LSM aufgenommenen z-Stapel zunächst in sogenannte Maximumintensitätsprojektionen (maximum intensity projection) umgewandelt werden, was innerhalb der ZEN-Software (Carl Zeiss) erfolgte. Bei diesem standardisierten Prozess wurde punktweise die Bildinformation sämtlicher optischer Schnitte, die am Aufbau des jeweils zugrunde liegenden z-Stapels beteiligt waren, auf die maximale Intensität reduziert, wodurch aus den 3D-Aufnahmen 2D-Abbildungen entstanden. Bei diesem Vorgang gingen zwar die Informationen der dritten Dimension, welche v. a. orthogonal lokalisierte Spines betrafen, verloren, dennoch war die automatisierte 2D-Analyse mit der bisherigen manuellen Auswertung auf Basis Golgi-gefärbter Schnitte vergleichbar, da auch in diesem Fall 2D-Lichtmikroskop-Aufnahmen zugrunde lagen, in denen primär laterale Spines erfasst wurden. Die Maximumintensitätsprojektionen (vgl. Abb. 19A) wurden im zvi-Format (AxioVision Version 4.8.2.0; Carl Zeiss) in Definiens eingelesen und die synaptischen Dornfortsätze unter Anwendung des 2D-Algorithmus aus

dem selbst entwickelten Spine-Analyse-Modul in ihrer Gesamtheit quantifiziert. Um die Software-basierte Spine-Evaluation zu ermöglichen, musste im ersten Schritt der Dendrit mit den darauf befindlichen Dornfortsätzen zuverlässig als zusammenhängendes Objekt vom Hintergrund abgegrenzt werden (s. Abb. 19B), was als Segmentierung bezeichnet wird. Hierzu wurde ein automatisches Schwellwertverfahren in zwei Stufen eingesetzt. Dieses Verfahren nahm sowohl das Grauwerthistogramm des Bildes als auch die Informationen zur Homogenität der Bilddaten in Betracht. In der ersten Stufe wurde für das gesamte Bild ein Schwellwert (T_1) berechnet, um den Vordergrund vom Hintergrund zu trennen. Da in den Bildern Rauschen und/oder Abbildungsartefakte vorhanden waren, wurde in Stufe zwei für den Vordergrund erneut ein Schwellwert (T_2) bestimmt. Die optimale Abgrenzung zwischen Dendrit und Hintergrund lag erfahrungsgemäß in dem Intervall zwischen T_1 und T_2 , gegeben durch die beiden Schwellwerte aus den Stufen 1 und 2. Über eine benutzerdefinierte Gewichtung α konnte der gewünschte Grenzwert eingestellt werden. Mit einer Gewichtung von $\alpha = 0,6$ wurde derjenige Schwellwert bestimmt, der die bestmögliche Differenzierung zwischen dem gewünschten Objekt (Dendrit) und dessen Hintergrund erbrachte. Nach der Segmentierung des Vordergrundobjektes erfolgte die Abgrenzung zwischen dem Dendrit, in Abbildung 19C gelb dargestellt, sowie den in Abbildung 19C grün markierten Spines und damit die Detektion der Dornfortsätze. Hierzu wurde zuerst über eine Berechnung der Entfernung zum Hintergrund die Mittelachse des Dendriten festgelegt. Diese Mittelachse wurde anschließend solange „aufgeblasen“, bis sie überall grob den Dendriten-Bereich umfasste. Lediglich kleine Objekte mit großer Distanz zur Mittelachse wurden hierbei nicht erfasst. Diese Objekte galten als „Spine-Kandidaten“. Nach einer finalen Glättung unter Berücksichtigung der Oberflächenspannung des Dendriten sowie einer Klassifikation auf Basis der Größe blieben nur noch die tatsächlichen Spines übrig. Gemäß geometrischer Eigenschaften wurde versucht, Verschmelzungen von Spines zu separieren, bevor jeder einzelne Spine in die zwei typischen Bereiche „Kopf“ und „Hals“ unterteilt wurde. Neben der Gesamtquantität der dendritischen Spines wurde auch die Dendritenlänge [μm] automatisiert bestimmt. Für jedes Versuchstier wurde aus den Einzelwerten pro Gehirnregion der Mittelwert berechnet, welcher für die statistische Gegenüberstellung genutzt wurde.

Abb. 19: Automatisierte 2D-Spine-Quantifizierung unter Nutzung von Definiens Architect XD

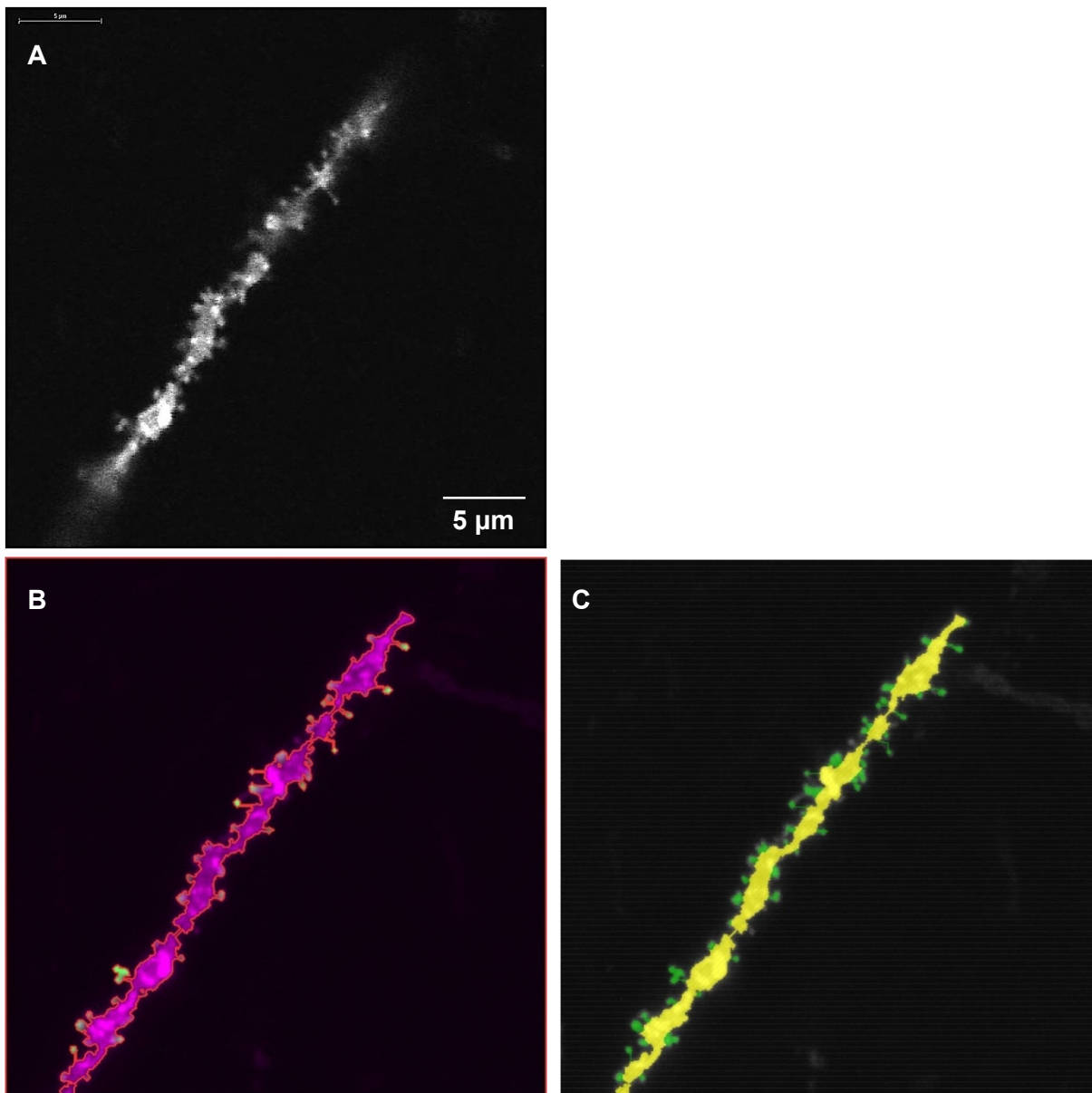


Foto A zeigt die 2D-Maximumintensitätsprojektion des Original-LSM-Bildes (LSM510) in der Definiens Analyse-Software. Im Zuge der Etablierung der automatisierten 2D-Spine-Detektion auf Basis eines selbst entwickelten Algorithmus war der erste wichtige Schritt die Abgrenzung zwischen dem zu identifizierenden Objekt (Dendrit und Spines) und dem Hintergrund, was bedingt durch Bildrauschen und Streuungseffekte durchaus eine Herausforderung war. Bild B verdeutlicht diesen als Segmentierung bezeichneten Schritt innerhalb des Spine-Analyse-Moduls. Der Dendrit und die darauf lokalisierten Spines heben sich als eine Einheit violett markiert vom schwarzen Hintergrund ab. Mit zunehmender Distanz zwischen dem äußersten Punkt des Dornfortsatzes bzw. dessen Kopf und dem Dendrit verändert sich die Markierung von violett nach grünlich. Die Abbildung C demonstriert den zweiten essentiellen Schritt der automatisierten 2D-Spine-Detektion, nämlich die Identifizierung der synaptischen Dornfortsätze (grün) und deren Differenzierung vom Dendrit (gelb).

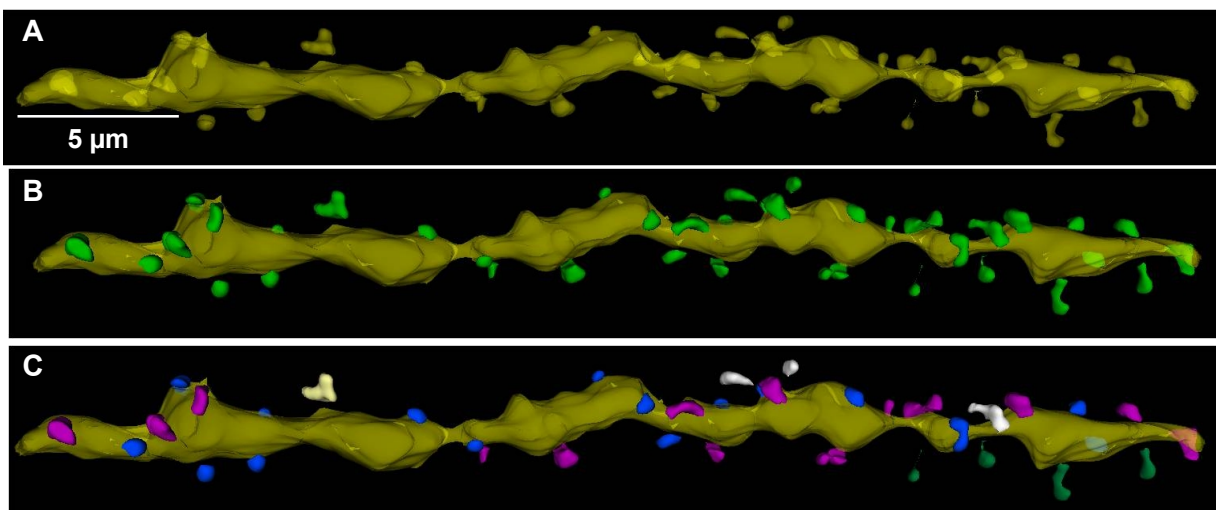
Nach der Etablierung und Verifizierung der automatisierten 2D-Spine-Quantifizierung wurde darauf aufbauend der 3D-Algorithmus des Spine-Analyse-Moduls entwickelt, welcher neben einer Quantifizierung auch eine Spine-Klassifikation ermöglichte. Für die Detektion der Spines wurden die einzelnen zuvor beschriebenen Analyseschritte auf 3D-Fähigkeit erweitert. Anschließend wurde auf Basis der für die vier ausgewerteten Spine-Klassen jeweils charakteristischen Merkmale (s. o. Abb. 18) sowie unter Berücksichtigung Hirnregion-spezifischer Anpassungen eine Klassifikation der Spines vorgenommen. Diesbezüglich mussten die geeigneten Segmentierungs-, Detektions- und Klassifizierungsparameter zuerst definiert und danach validiert werden. Hierfür wurden zum einen exemplarische Messungen der Mushroom-, Thin-, Stubby- und Filopodia-Spines mit Hilfe der Neurolucida-Software (MBF Bioscience) vorgenommen, zum anderen wurden die Erfahrungswerte aus der 2D-Analyse herangezogen, um eine erste Parametrisierung der 3D-Analyse zu erstellen. Daraufhin wurden die Resultate der automatischen 3D-Spine-Evaluation mit den Ergebnissen der 2D-Auswertung korreliert. Nach einer schrittweisen Optimierung der Segmentierungs-, Detektions- und Klassifikationsparameter innerhalb des Definiens-Moduls konnte die Konformität zwischen 2D- und 3D-Spine-Analyse bestätigt und der 3D-Algorithmus für die Untersuchung von Quantität und Morphologie der Dornfortsätze eingesetzt werden.

Für die automatische 3D-Spine-Analyse wurden die konfokalen 3D-Aufnahmen zunächst im zvi-Bildformat (AxioVision; Carl Zeiss) in die Definiens-Software eingelesen (vgl. Abb. 19A), um dann die Quantifizierung sowie Klassifizierung der synaptischen Dornfortsätze unter Einsatz des eigens für die Spine-Analyse entwickelten 3D-Algorithmus durchzuführen. Auf der Grundlage zuvor definierter Parameter (s. o.) wurden die Spines dreidimensional detektiert und gemäß ihrer Morphologie einer von vier Spine-Klassen - Mushroom-, Thin-, Stubby-, Filopodia-Spines - zugewiesen, wie in den Abbildungen 20C und 21a + b exemplarisch dargestellt. Für das Klassifikationsverfahren wurden für die jeweilige Spine-Klasse zwei sogenannte Zugehörigkeitsfunktionen („membership functions“) der beiden Spine-Merkmale „Länge“ und „Kopfdurchmesser“ verwendet. Eine Zugehörigkeitsfunktion beschreibt für ein Intervall [MIN, MAX] die Zugehörigkeit als eine kontinuierliche Funktion mit (Zugehörigkeits-) Werten zwischen 0 und 1. Die Zugehörigkeit außerhalb des Intervalls wird durch die Randbedingungen gegeben. Die Spine-Klasse mit dem größten Klassifikationswert, definiert als Minimum der beiden Zugehörigkeitswerte, wurde dem entsprechenden Dornfortsatz zugewiesen. Mushroom-Spines wurden in Grün, Thin-Spines in Violett, Stubby-Spines in Dunkelblau und Filopodia-Spines in Hellblau im

Ergebnisbild dargestellt (vgl. Abb. 20C und 21a + b). Solche synaptischen Dornfortsätze, die aufgrund ihrer ungewöhnlichen morphologischen Erscheinung keiner der definierten Spine-Klassen zugeordnet werden konnten (Klassifikationswert = 0 für alle Klassen), wurden von der Software als „undefined spines“ deklariert und in Weiß kenntlich gemacht (s. Abb. 21b). Diese Spines undefinierter Morphologie wurden im Anschluss an die automatisierte Evaluation manuell nachklassifiziert. Dazu wurden die konfokalen Bilder in der Definiens-Software geöffnet und die im Ergebnisbild der 3D-Auswertung farblich gekennzeichneten „undefined spines“ sorgfältig unter Ausnutzung verschiedener Programm-Optionen, wie dreidimensionales Rotieren und Zoomen, einzeln betrachtet. Zusätzlich wurden die automatisch detektierten und rekonstruierten, aber nicht klassifizierten Dornfortsätze mit den Original-3D-Datensätzen verglichen. Hierfür wurde die ZEN-Software (Carl Zeiss) verwendet, die ebenfalls eine 3D-Rotation sowie eine Objektvergrößerung mittels Zoomen erlaubte. Anhand der ausführlichen dreidimensionalen Beurteilung der Spine-Morphologie und unter Beachtung der in Abbildung 18 aufgeführten Differenzierungskriterien (s. o.) wurden die bislang nicht-klassifizierten Dornfortsätze manuell ihrer adäquaten Spine-Klasse zugewiesen. Oftmals handelte es sich jedoch bei den „undefined spines“ nicht um einzelne Dornfortsätze auffälliger Morphologie (vgl. Abb. 21b, B), sondern um Komplexe aus zwei oder mehr Spines (s. Abb. 21b, A). In diesen Fällen wurden die Spine-Komplexe als „undefined spines“ beibehalten, um eine Verfälschung der Quantitäten der vier Spine-Klassen aufgrund der manuellen Nachklassifizierung zu vermeiden. Die Bezeichnung „undefined spine“ blieb auch dann bestehen, wenn der entsprechende Dornfortsatz aufgrund einer sehr willkürlichen morphologischen Erscheinung die definierten Klassifikationsmerkmale keiner der vier Subtypen erfüllte. Dies war beispielsweise dann gegeben, wenn das Analyse-Modul primär den Kopf des Spines detektierte, der Hals, d. h. die Verbindung zum Dendrit, aber kaum erkennbar war, wie unten in Abbildung 21b, B verdeutlicht. Die Anzahl der „undefined spines“ wurde letztlich in der Gesamt-Spinedichte berücksichtigt. Darüber hinaus traten zum Teil Strukturen auf, die von dem Algorithmus zwar als nicht zum Dendrit gehörig erkannt und von diesem separiert wurden, die jedoch primär aufgrund ihres ungewöhnlich hohen, durch die Software ermittelten Volumens auch nicht als Dornfortsätze detektiert wurden. Diese als „passive“ deklarierten und in Beige kenntlich gemachten Gebilde wurden nicht zur Gesamtzahl der Spines gezählt. Die automatisch ermittelten und gegebenenfalls manuell korrigierten Spine-Quantitäten wurden für jedes konfokale Bild bzw. jedes aufgenommene Dendritensegment separat in einer Excel-

Tabelle gespeichert. Dabei wurden die Gesamtzahl aller Spines, die Quantitäten der morphologischen Subtypen Mushroom-, Thin-, Stubby- und Filopodia-Spines, die Länge des Dendriten [μm] sowie die Anzahl der u. U. noch verbliebenen „undefined spines“ als absolute Zahlenwerte ausgewiesen. Für die Statistik wurden daraus die Anzahlen der verschiedenen Spines je μm errechnet. Außerdem wurden die Einzelwerte einer Hirnregion für jedes Tier zusammengefasst und gemittelt, so dass pro Tier ein Mittelwert je Gehirnnareal in die statistische Auswertung einfluss.

Abb. 20: Automatisierte 3D-Spine-Analyse mit dem für Definiens Architect XD entwickelten Spine-Analyse-Modul



Auf den oben beschriebenen (vgl. Abb. 19) 2D-Segmentierungs- und Detektionsalgorithmen aufbauend war es auch für die Entwicklung der 3D-Spine-Analyse zunächst entscheidend, eine Segmentierung vorzunehmen, um damit eine Abgrenzung zwischen dem Dendrit bzw. den darauf befindlichen Spines und dem Hintergrund zu erreichen. Dendrit und Spines wurden dabei zunächst als ein Objekt abgebildet (A). In Bild B ist die Detektion der synaptischen Dornfortsätze (grün) und somit ihre Abgrenzung gegenüber dem Dendrit (olivgrün) zu sehen. Nachdem die Spines, ähnlich wie bei der bereits erläuterten 2D-Evaluation, hier dreidimensional rekonstruiert worden waren, erfolgte im letzten Schritt der Etablierung der automatischen 3D-Spine-Analyse die Klassifizierung der Dornfortsätze. Das bedeutet, dass der dafür entwickelte Algorithmus auf der Grundlage zuvor definierter morphologischer Kriterien die Differenzierung verschiedener Spine-Subtypen vornahm. Visuell wurden diese mittels individueller Farbgebung voneinander unterschieden, wie in Foto C veranschaulicht. Mushroom-Spines wurden grün markiert, Thin-Spines violett, Stubby-Spines dunkelblau, Filopodia-Spines hellblau, „undefined spines“ weiß und weder als Spine noch als Dendrit erkannte Strukturen („passive“) beige.

Abb. 21a: Automatisierte 3D-Spine-Klassifikation via Definiens Architect XD

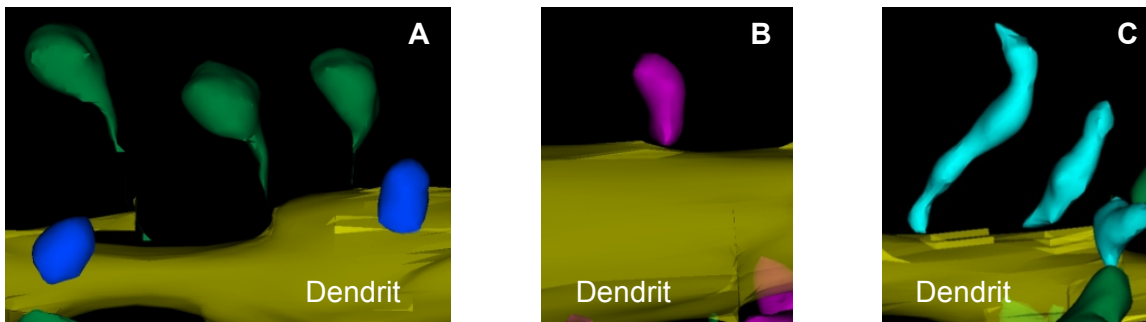
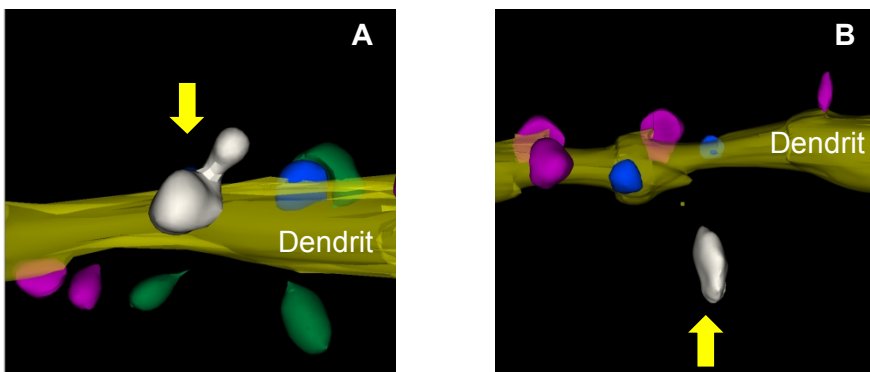


Abbildung 21a (A-C) zeigt exemplarisch die automatisierte dreidimensionale Detektion und Klassifikation synaptischer Dornfortsätze auf der Grundlage des etablierten Spine-Analyse-Moduls in der Definiens Architect XD-Software. Dendrit und Spines sind hier stark vergrößert dargestellt. Grün: Mushroom-Spines (A), dunkelblau: Stubby-Spines (A), violett: Thin-Spines (B), hellblau: Filopodia-Spines (C), olivgrün: Dendrit (A-C).

Abb. 21b: Beispielhafte Exemplare synaptischer Dornfortsätze undefinierter Morphologie („undefined spines“)

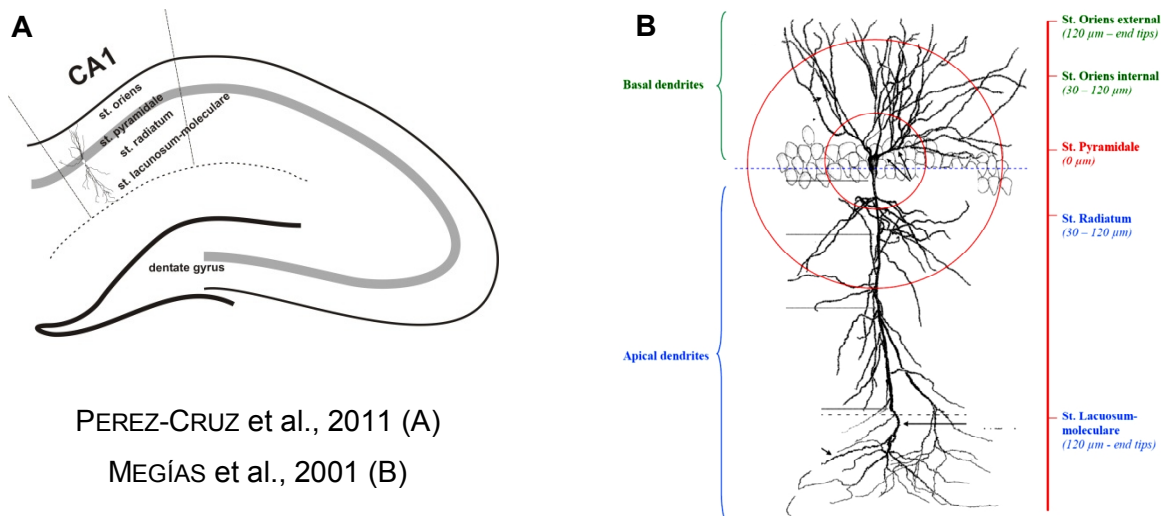


In Abbildung 21b (A+B) werden durch die gelben Pfeile beispielhaft zwei Exemplare für Spines undefinierter Morphologie („undefined spines“) gekennzeichnet. In Bild A liegt ein Komplex (weiß) vor, in dem zwei Dornfortsätze aufgrund ihrer Lokalisation von dem Spine-Analyse-Modul zusammenhängend erfasst und als „undefined spine“ eingeordnet wurden. Die Darstellung B demonstriert einen Dornfortsatz ungewöhnlicher Morphologie (weiß), der aufgrund seiner untypischen Erscheinung die Differenzierungskriterien keiner der vier ausgewerteten Spine-Klassen erfüllte und deshalb den „undefined spines“ zugewiesen blieb. Dendrit und Spines sind hier stark vergrößert dargestellt. Grün: Mushroom-Spines (A), dunkelblau: Stubby-Spines (A+B), violett: Thin-Spines (A+B), weiß: „undefined spines“ (A+B), olivgrün: Dendrit (A+B).

5.3 Etablierung einer optimierten Methode zur Quantifizierung synaptischer Dornfortsätze im Vorderhirn von Mäusen

Im Zuge der Methodenetablierung zur 3D-Quantifizierung und -Klassifizierung synaptischer Dornfortsätze wurden zunächst die Resultate der ballistischen Fluoreszenzmarkierung (Gene Gun) mit denen der histologischen Golgi Cox-Färbung verglichen. Hierfür wurden Koronarschnitte des murinen APPSWE-Modells des Morbus Alzheimer herangezogen, da für dieses Tiermodell bereits Resultate aus der Golgi-Färbung vorlagen, die als Referenz dienten und den Gene Gun-Ergebnissen gegenübergestellt werden konnten (PEREZ-CRUZ et al., 2011). Es wurden die Spine-Morphologie und -Quantität der distalen, basalen Dendritensegmente hippokampaler CA1-Pyramidenneurone der rechten Hirnhemisphäre analysiert, wie unten in Abbildung 22 schematisch verdeutlicht. Sowohl die 2D-Auswertung Golgi-gefärbter als auch die 3D-Analyse Dil-markierter Dendriten fand manuell statt (Neurolucida-Software). Die Gegenüberstellung der Ergebnisse sollte letztlich die Ersetzbarkeit des 2D-Golgi-Verfahrens durch die 3D-Gene Gun-Technik bestätigen. Ein weiteres Ziel dieses Arbeitsabschnitts war es, mittels 3D-Analyse konfokaler Bildaufnahmen neben der Spine-Quantifizierung eine präzise morphologische Klassifizierung der synaptischen Dornfortsätze in Mushroom-, Thin-, Stubby- und Filopodia-Spines vorzunehmen. In diesem Zusammenhang galt es, nach der Etablierung eines 2D-Spine-Detektionsalgorithmus innerhalb der Definiens Architect XD-Software (vgl. Abb. 19) einen adäquaten 3D-Spine-Differenzierungsalgorithmus für das Spine-Analyse-Modul zu entwickeln und validieren, um schließlich die 3D-Spine-Evaluation automatisch durchführen zu können (s. Abb. 20 + 21).

Abb. 22: Schematische Darstellung der dorsalen hippocampalen CA1-Region sowie eines dort lokalisierten Pyramidenneurons



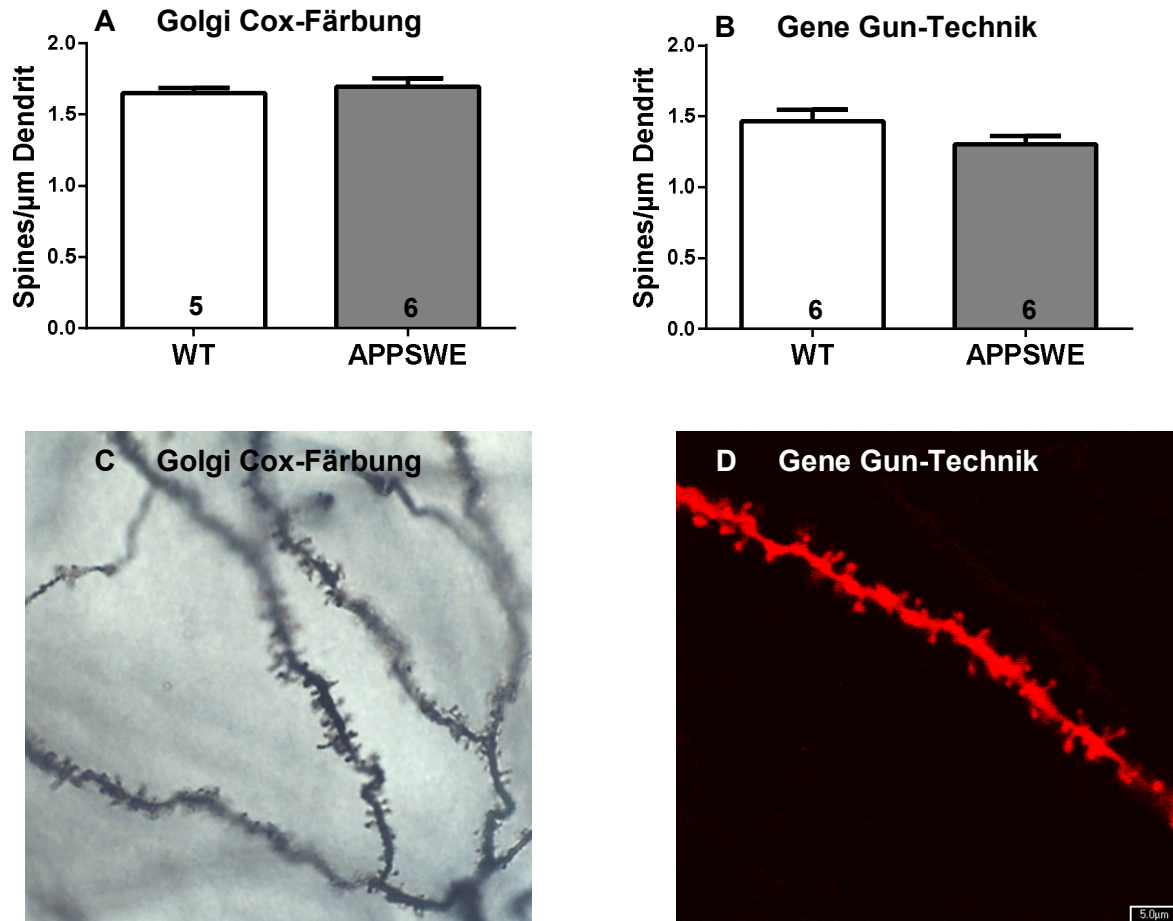
In Abbildung 22, A ist schematisch die CA1-Region (Cornu Ammonis, Areal 1) des dorsalen Hippokampus dargestellt, welche im Rahmen der Etablierung der automatisierten Spine-Analyse evaluiert wurde. Die Perikarya der untersuchten Pyramidenneurone sind im Stratum pyramidale lokalisiert. Im rechtsseitigen Bild (B) ist die Morphologie eines CA1-Pyramidenneurons skizziert, welche die basalen und apikalen Dendritenbäume erkennen lässt. Für die Spine-Analyse wurden ausschließlich distale, basale Dendritensegmente herangezogen, die dementsprechend im Stratum oriens gelegen waren und eine Distanz von 120 µm oder mehr zum Perikaryon aufwiesen.

5.3.1 Quantifizierung und Klassifizierung synaptischer Dornfortsätze in acht Monate alten APPSWE-Mäusen: Golgi Cox-Färbung vs. Gene Gun-Technik

Die folgende Abbildung 23 demonstriert die Resultate der manuellen Spine-Quantifizierung auf distalen, basalen Dendritensegmenten in CA1 acht Monate alter, weiblicher transgener APPSWE-Mäuse (Tg2576) im Vergleich zum Wildtyp (WT), welche einerseits auf der Golgi Cox-Färbung (A), andererseits auf der Gene Gun-Technik (B) beruhen. Bezüglich der Golgi-Färbung wurden 3-4 Neurone pro Tier und mehrheitlich 3-4 (selten 2) dendritische Segmente je Neuron ausgewertet, für die Gene Gun-Technik waren es 9-10 Dendritenabschnitte je Versuchstier. Es ist darauf hinzuweisen, dass die 2D-Auswertung Golgi-gefärbter Dornfortsätze lediglich die eindeutige Differenzierung von Mushroom- und Filopodia-Spines erlaubte, welche sich durch eine klare, markante Morphologie auszeichnen und in der Regel zweifelsfrei von den Thin- und Stubby-Spines, die auf Basis der ballistischen Fluoreszenzmarkierung ebenfalls detektiert werden konnten, unterscheiden lassen. Die Gegenüberstellung der Gesamt-Spinezahlen beider

Methoden der manuellen Spine-Evaluation ergab keine nennenswerten Differenzen zwischen der Golgi Cox-Färbung (Abb. 23, A) und der Gene Gun-Methode (B).

Abb. 23: Gesamt-Spinedichte basaler distaler Dendritensegmente in CA1 acht Monate alter APPSWE-Mäuse: Golgi-Cox-Färbung vs. Gene Gun-Technik



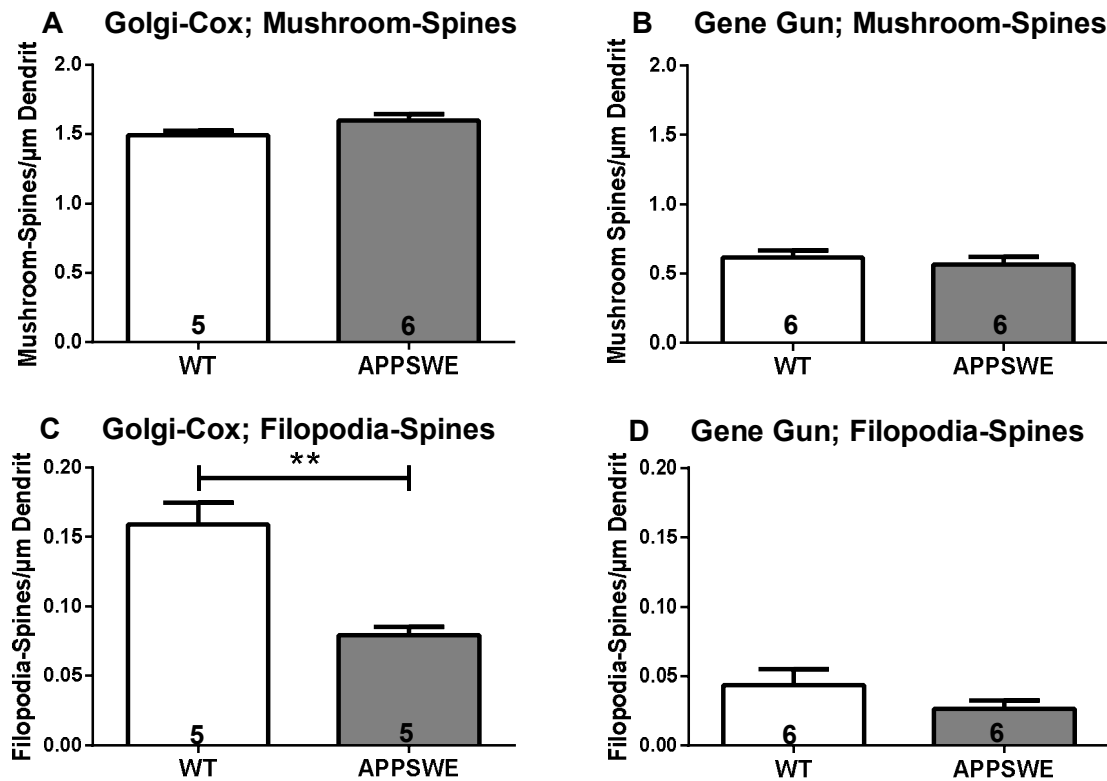
Dargestellt sind in A + B die Mittelwerte \pm SEM der Gesamt-Spinedichten je μm Dendrit für Wildtyp-Mäuse (WT) gegenüber transgenen APPSWE-Mäusen (Tg2576), die mit Hilfe Golgi-gefärbter (A + C) bzw. Gene Gun-markierter Spines (B + D) in CA1 (Cornu Ammonis, Areal 1) ermittelt wurden. Die Ziffern innerhalb der Säulen kennzeichnen die jeweilige Gruppengröße. Maßstab: 5 μm .

Hinsichtlich der Gesamtzahl der synaptischen Dornfortsätze der WT-Tiergruppe lieferten beide Darstellungsmethoden vergleichbare Resultate (Golgi: $1,65 \pm 0,034$ Spines/ μm Dendrit; Abb. 23, A; Gene Gun: $1,47 \pm 0,082$ Spines/ μm Dendrit; Abb. 23, B). Weder mittels der Golgi-Färbung noch anhand des Gene Gun-Verfahrens konnte ein Defizit in der Spinedichte für die transgenen Mäuse gegenüber den WT-Kontrollen festgestellt werden (Golgi: $1,70 \pm 0,055$ Spines/ μm Dendrit; $p = 0,5313$; Abb. 23 A; Gene Gun: $1,30 \pm 0,061$ Spines/ μm Dendrit; $p = 0,1408$, jeweils ungepaarter, zweiseitiger t-Test (u. z.s. t-Test);

Abb. 23, B). Die Übereinstimmung der Resultate beider Methoden der manuellen Spine-Quantifizierung spricht für die Substituierbarkeit beider Verfahren. Demnach konnte die weniger aufwändige, detailgetreue und dreidimensional auswertbare Gene Gun-Technik künftig anstelle der zeitintensiven, lichtmikroskopisch abgebildeten und zweidimensional evaluierbaren Golgi-Cox-Färbung zur Markierung und Analyse der synaptischen Dornfortsätze eingesetzt werden.

Abbildung 24 veranschaulicht die zur Überprüfung der Konformität der Ergebnisse ebenfalls berechneten Mittelwerte der Mushroom- (A, B) und Filopodia-Spines (C, D), die sich jeweils aus der Spine-Klassifizierung Golgi- (A, C) bzw. Gene Gun-markierter (B, D) basal-distaler Dendritensegmente in CA1 ergaben. Wie bereits oben erwähnt, konnte basierend auf der 2-dimensionalen Golgi Cox-Technik (Abb. 24, A+C) lediglich die Klassifizierung von Mushroom- und Filopodia-Spines eindeutig vorgenommen werden, was zu einer erheblichen Überschätzung dieser beiden Subtypen im Vergleich zur Gene Gun-Methode (Abb. 24, B+D) führte. Dementsprechend resultierten aus der Golgi-Färbung gegenüber dem Gene Gun-Verfahren zum einen eine 2,4- (WT) bzw. 2,8-fache (Tg) Anzahl an Mushroom-Spines (vgl. Abb. 24, A und B), zum anderen eine 3,7- (WT) bzw. 3-fache (Tg) Quantität Filopodia-Spines (s. Abb. 24, C und D). Die Gene Gun-Methodik in Verbindung mit der Analyse konfokaler 3D-Bildstapel ermöglichte hingegen eine bessere Betrachtung und weitaus präzisere Differenzierung der synaptischen Dornfortsätze in v. a. Mushroom-, Thin-, Stubby- und Filopodia-Spines sowie Dornfortsätze nicht identifizierbarer Morphologie („undefined spines“). Aufgrund der unter Golgi-bedingten Verhältnissen teilweise ähnlich erscheinenden Morphologie zwischen Thin- und Mushroom-Spines (Kopf, Hals) ist davon auszugehen, dass ein entscheidender Anteil der Thin-Spines zur Klasse der Mushrooms gezählt wurde.

Abb. 24: Gesamtzahlen an Mushroom- sowie Filopodia-Spines basaler distaler Dendritensegmente in CA1 acht Monate alter APPSWE-Mäuse: Golgi-Cox-Färbung vs. Gene Gun-Technik



Dargestellt sind in A + B die Mittelwerte \pm SEM der Mushroom-Spinedichten bzw. in C + D der Filopodia-Spinedichten je μm Dendrit für Wildtyp-Mäuse (WT) gegenüber transgenen APPSWE-Mäusen (Tg2576), die mit Hilfe Golgi-gefärbter (A + C) bzw. Gene Gun-markierter Spines (B + D) in CA1 (Cornu Ammonis, Areal 1) ermittelt wurden. Die Ziffern innerhalb der Säulen kennzeichnen die jeweilige Gruppengröße. **: signifikant, $p = 0,0013$.

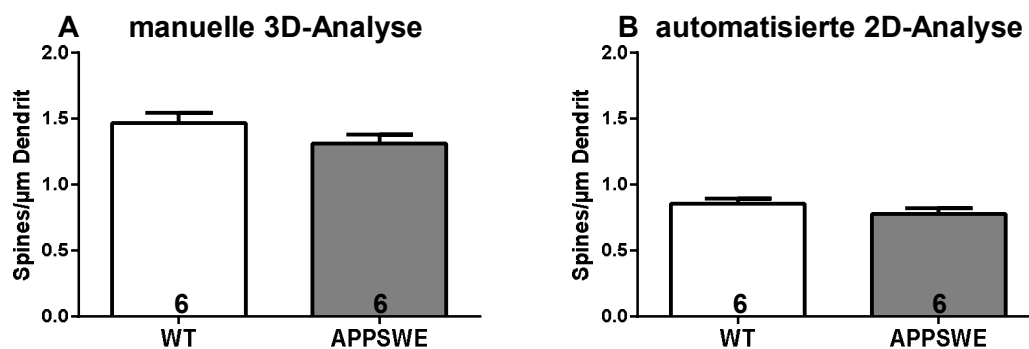
Die Spine-Quantifizierung gemäß der Golgi-Imprägnation ergab $1,49 \pm 0,033$ Mushroom-Spines/ μm Dendrit für die Wildtypen bzw. $1,60 \pm 0,045$ Mushroom-Spines/ μm Dendrit für die transgenen Mäuse (A; $p = 0,0983$, u. z.s. t-Test). Die Anwendung der Gene Gun-Technik führte zu $0,62 \pm 0,050$ bzw. $0,56 \pm 0,055$ Mushroom-Spines/ μm Dendrit für die Kontroll- bzw. transgenen Tiere (B; $p = 0,4984$, u. z.s. t-Test). Während die Golgi-Färbung eine signifikante Abnahme (** $p = 0,0013$, u. z.s. t-Test) der Filopodia-Spines in den APPSWE-Mäusen ($0,079 \pm 0,0063$ Filopodia/ μm Dendrit) verglichen mit den Wildtypen ($0,16 \pm 0,015$ Filopodia/ μm Dendrit) offenlegte (C), erbrachte die ballistische Fluoreszenzmarkierung keinerlei Unterschiede zwischen den beiden Versuchstiergruppen (D; WT: $0,043 \pm 0,012$ Filopodia/ μm Dendrit; APPSWE: $0,026 \pm 0,006$ Filopodia/ μm Dendrit; $p = 0,2267$, u. z.s. t-Test). Zur Überprüfung eines möglichen Transgen-Effekts in älteren Tieren wurde die Untersuchung der synaptischen Dornfortsätze erneut in 14

Monate alten APPSWE-Mäusen und WT-Kontrollen durchgeführt; die Resultate werden in Graphik 26a veranschaulicht.

5.3.2 Spine-Quantifizierung: Manuelle 3D- vs. automatisierte 2D-Analyse

Nachdem die Konformität der Golgi- und Gene Gun-Daten verifiziert und die Gene Gun-Methode als Verfahren der Wahl für die Spine-Analyse etabliert worden war, wurde darauf aufbauend die Entwicklung des Spine-Analyse-Moduls zur automatisierten Spine-Evaluation unter Einsatz der Definiens-Software vorangetrieben. Hierfür wurden die bereits manuell ausgewerteten, Dil-markierten Koronarschnitte der acht Monate alten, transgenen weiblichen APPSWE-Mäuse (Tg2576) sowie der WT-Tiere nochmals der Software-basierten 2D-Analyse unterzogen und die daraus folgenden Resultate den Ergebnissen der manuellen 3D-Auswertung (s. o.) gegenübergestellt (Abb. 25) bzw. mit diesen korreliert (Tab. 6). Die Abbildung 25, A + B zeigt die mittleren Gesamt-Spinedichten je μm basaler, distaler Dendrit der Pyramidenzellen in CA1, wobei der linksseitige Graph (A) die Gesamt-Spinedichte nach manueller 3D-Evaluation (Neurolucida), das rechtsseitige Diagramm (B) die Gesamt-Spinequantität nach automatisierter 2D-Definiens-Auswertung zeigt.

Abb. 25: Gesamt-Spinedichte basaler distaler Dendritensegmente in CA1 acht Monate alter APPSWE-Mäuse: Manuelle 3D- vs. automatisierte 2D-Analyse



Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der Gesamt-Spinedichten je μm Dendrit für Wildtyp-Mäuse (WT) gegenüber transgenen APPSWE-Mäusen (Tg2576), die manuell und dreidimensional (A) bzw. automatisiert und zweidimensional (B) anhand Dil-markierter Spines in CA1 (Cornu Ammonis, Areal 1) erfasst wurden. Die Ziffern innerhalb der Säulen kennzeichnen die jeweilige Gruppengröße.

Weder die manuelle 3D- ($p = 0,1537$; Abb. 25, A) noch die automatisierte 2D-Evaluation ($p = 0,1892$, jeweils u. z.s. t-Test; B) der synaptischen Dornfortsätze basaler

Dendritensegmente in CA1 ergab signifikante Unterschiede zwischen den WT- und transgenen Tieren. Anhand der manuellen 3D-Auswertung (A; WT: $1,47 \pm 0,082$ Spines/ μm Dendrit; Tg2576: $1,30 \pm 0,061$ Spines/ μm Dendrit) wurde allerdings sowohl für die WT-Tiere als auch für die APPSWE-Mäuse die 1,7-fache Gesamtmenge an synaptischen Dornfortsätzen verglichen mit den Ergebnissen der Software-gestützten 2D-Analyse (B; WT: $0,86 \pm 0,036$ Spines/ μm Dendrit; Tg2576: $0,78 \pm 0,045$ Spines/ μm Dendrit) ermittelt (s. auch Tab. 5). Dies ist ein schlüssiger Befund, da durch den Wegfall der dritten Ebene im Rahmen der 2D-Evaluation die in der z-Ebene enthaltenen Dornfortsätze verloren gingen. Bei der 3-dimensionalen Beurteilung konnten diese Informationen hingegen anhand der optischen Schnitte eingeschlossen werden.

Tab. 5: Gegenüberstellung der Resultate der drei Spine-Analyse-Verfahren

Wildtyp-Mäuse (WT)	Spines gesamt	Mushroom-Spines	Filopodia-Spines
Golgi (manuell 2D)	$1,652 \pm 0,034$	$1,493 \pm 0,033$	$0,1592 \pm 0,015$
Gene Gun (manuell 3D)	$1,467 \pm 0,082$	$0,6166 \pm 0,050$	$0,04322 \pm 0,012$
Gene Gun (automatisiert 2D)	$0,8576 \pm 0,036$		
APPSWE-Mäuse (Tg2576)	Spines gesamt	Mushroom-Spines	Filopodia-Spines
Golgi (manuell 2D)	$1,697 \pm 0,055$	$1,599 \pm 0,045$	$0,0790 \pm 0,0063$
Gene Gun (manuell 3D)	$1,303 \pm 0,061$	$0,5645 \pm 0,055$	$0,02630 \pm 0,0062$
Gene Gun (automatisiert 2D)	$0,7764 \pm 0,045$		

Angegeben sind die Spinezahlen je μm Dendrit, die mit Hilfe der drei Analyse-Verfahren in CA1 (Cornu Ammonis, Areal 1) des dorsalen Hippokampus eruiert wurden. Die Differenz von $0,8072$ Spines/ μm (Gene Gun 3D) bezüglich der WT-Tiere repräsentiert den Anteil der Thin-, Stubby- sowie „undefined“ Spines, welche demnach etwa 55 % der Gesamt-Spinedichte ausmachen. Entsprechendes gilt auch für die Divergenz in Höhe von $0,7122$ Spines/ μm hinsichtlich der Tg2576-Mäuse – auch hier wurden die fehlenden 55 % in Bezug auf die gesamte Spinezahl von Thin-, Stubby- und „undefined“ Spines eingenommen. Die Diskrepanz von $0,019$ Spines/ μm , welche für die 2D-Auswertung der Golgi-Färbung in den transgenen Tieren auffällt, ist auf einen Ausreißer zurückzuführen, der aus der statistischen Analyse der Filopodia-Spines exkludiert wurde.

5.3.3 Korrelation zwischen manueller 3D- und automatisierter 2D-Spine-Analyse

Zur Verifizierung der Konformität der Software-basierten 2D-Spine-Evaluation mit der manuellen 3D-Auswertung (s. o.) wurden die Daten beider Verfahren auf der Grundlage der parametrischen Korrelationsanalyse nach Pearson (r = Korrelationskoeffizient) zueinander in Verbindung gesetzt. Hierfür wurde die jeweilige Gesamtzahl der untersuchten Dendritenabschnitte pro Versuchstiergruppe herangezogen. Wie aus Tabelle 6 hervorgeht, ergab sich aus dieser statistischen Überprüfung sowohl für die WT-Mäuse ($n = 56$, $r = 0,5339$) als auch für die transgenen APPSWE-Mäuse ($n = 52$, $r = 0,7607$) ein hoch-signifikanter linearer Zusammenhang ($*** p < 0,0001$) zwischen den Gesamt-Spinezahlen (Spines/ μm Dendrit) beider auf der ballistischen Fluoreszenzmarkierung beruhender Quantifizierungsverfahren. Die Korrelationskoeffizienten weisen außerdem darauf hin, dass es sich jeweils um positive Abhängigkeiten handelt. Demnach ging eine hohe Spinequantität, die manuell und dreidimensional ermittelt wurde, ebenfalls mit einer hohen Spinedichte, die automatisch und zweidimensional erzielt wurde, einher. Daraus kann geschlossen werden, dass die Software-gesteuerte Spine-Analyse Ergebnisse lieferte, die mit der manuellen Spine-Auswertung übereinstimmten, und somit das Definiens-Auswertungsprogramm für künftige Spine-Detektionen einsetzbar war. An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass für den direkten Vergleich der manuellen 3D- und automatisierten 2D-Spine-Daten eine genaue Qualitätskontrolle der konfokalen Bilder zu erfolgen hatte. Fotos mit geringem Signal-zu-Rausch-Verhältnis wurden von der Analyse ausgeschlossen.

Tab. 6: Resultate der Korrelationsanalyse der 2D- und 3D-Spinedichten in Wildtyp- und transgenen APPSWE-Mäusen

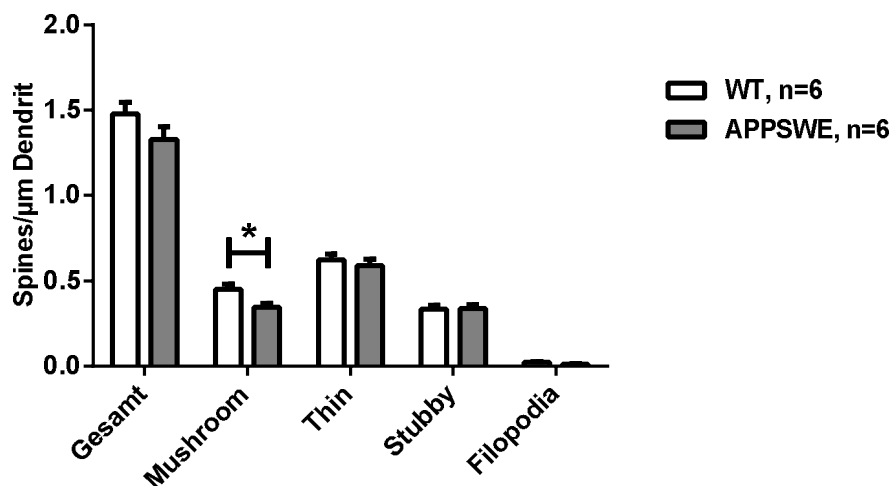
Tiergruppe	Anzahl korrelierter 2D- und 3D-Werte	Korrelationskoeffizient nach Pearson (r)	t-Test
WT	56	0,5339	*** $p < 0,0001$
Tg2576	52	0,7607	*** $p < 0,0001$

WT: Wildtyp-Mäuse, Tg2576: transgene APPSWE-Mäuse. ***: hochsignifikant.

5.4 Quantifizierung und Klassifizierung synaptischer Dornfortsätze in 14 Monate alten APPSWE-Mäusen

Wie oben angesprochen, wurde aufgrund des Fehlens eines Transgen-Effekts in acht Monate alten APPSWE-Mäusen gegenüber Kontrollen die quantitative wie auch morphologische Untersuchung der synaptischen Dornfortsätze erneut in 14 Monate alten, weiblichen APPSWE-Mäusen (Tg2789) vorgenommen. Die Spine-Evaluation konnte zu diesem Zeitpunkt automatisiert in 3D erfolgen, da der eigens für die Spine-Analyse entwickelte 3D-Detektions- und Klassifikationslogarithmus bereits etabliert war. Die Resultate der automatisierten 3D-Spine-Auswertung, welche sich auf die basalen distalen Dendritensegmente der CA1-Region des Hippokampus der linken Hirnhemisphäre bezog (vgl. Abb. 26b), sind in folgendem Diagramm der Abbildung 26a aufgeführt. Auch hier wurden bis auf eine Ausnahme (= 8 Fotos) 9-10 Dendritenabschnitte je Versuchstier ausgewertet.

Abb. 26a: Resultate der automatisierten 3D-Spine-Analyse basaler distaler Dendritensegmente in CA1 14 Monate alter APPSWE-Mäuse

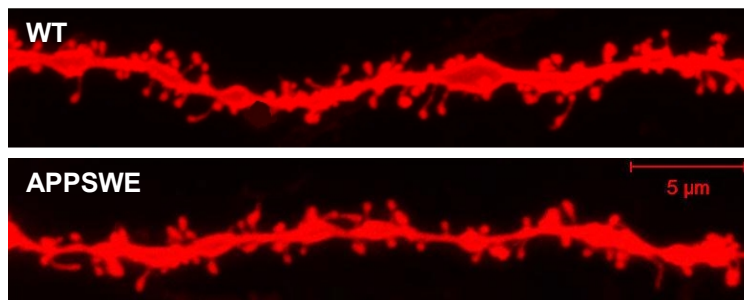


Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM sowohl der Gesamt-Spinedichte als auch der Quantitäten der vier analysierten Spine-Klassen je μm Dendrit in CA1 (Cornu Ammonis, Areal 1) für Wildtyp-Mäuse (WT) gegenüber transgenen APPSWE-Mäusen (Tg2789), * : signifikant, $p = 0,0202$.

Die Analyse der mittels Gene Gun-Technik markierten synaptischen Dornfortsätze zeigte eine signifikante Reduktion der Mushroom-Spines (Abb. 26a, $p < 0,05$; * $p = 0,0202$) in den 14 Monate alten APPSWE-Mäusen ($0,35 \pm 0,024$ Spines/ μm Dendrit) verglichen mit den Wildtypen ($0,45 \pm 0,030$ Spines/ μm Dendrit). Sowohl für die gesamte Spinedichte als

auch für die drei weiteren morphologisch differenten Spine-Klassen ließ sich kein weiterer signifikanter Transgen-Effekt nachweisen ($p > 0,05$, u. z.s. t-Test). Anders als in den acht Monate alten APPSWE-Mäusen (s. o.), konnte in den 14 Monate alten Tieren gegenüber WT-Kontrollen eine Auswirkung der Überexpression des mutierten humanen Amyloid-Beta-Peptids auf die Morphologie der synaptischen Dornfortsätze gezeigt werden.

Abb. 26b: Beispielhafte Exemplare Dil-markierter, basal-distaler Dendritensegmente in CA1 14 Monate alter APPSWE-Mäuse



In 2D-Ansicht abgebildet sind hier Beispiele Dil-markierter, basal-distaler Dendritensegmente mit Spines der Pyramidenneurone in CA1 (Cornu Ammonis, Areal 1) von Wildtyp-Mäusen (WT) gegenüber transgenen APPSWE-Mäusen (Tg2789). Exemplarische Mushroom-Spine-Zahlen der ausgewerteten Original-3D-Bildstapel: WT: 0,75 Mushroom-Spines/ μm ; APPSWE: 0,26 Mushroom-Spines / μm . Maßstab: 5 μm .

5.5 Funktionell-morphologische Charakterisierung von Synapsen im Vorderhirn präklinischer Maus- und Ratten-Modelle der Schizophrenie

5.5.1 Psychostimulans-basierte Modelle der Schizophrenie

In den zwei hier verwendeten Psychostimulans-basierten Rattenmodellen der Schizophrenie beruht die Erzeugung einer Schizophrenie-typischen Symptomatik auf der wiederholten Applikation von entweder d-Amphetaminsulfat oder Quinpirolhydrochlorid. Die Effekte dieser subchronischen Substanzgabe wurden mit denen einer akuten, d. h. einmaligen, AMPH- bzw. Quinp.-Injektion verglichen, was sowohl anhand der Resultate des OF-Verhaltenstests als auch auf Basis histologischer und morphologischer Daten erfolgte. In Anlehnung an die Literatur (z. B. SULLIVAN et al., 1998; PELEG-RAIBSTEIN et al., 2008+2009; SINGER et al., 2009) wurde aufgrund des stimulierenden Effekts der verabreichten Psychostimulanzien eine applikationsbedingte, als lokomotorische Sensitivierung bezeichnete Hyperaktivität der entsprechenden Versuchstiere erwartet. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die lokomotorische Aktivität nach subkutaner Verabreichung der Psychostimulanzien gegenüber Vehikel-Gabe mittels Messung der insgesamt zurückgelegten Laufstrecke [cm] während des Verhaltenstests im OF bestimmt. Um die erwartete Verhaltensänderung mit möglichen neuroanatomischen Modifikationen in Verbindung bringen zu können, wurden in verschiedenen Gehirnarealen PV⁺ Interneuronpopulationen immunhistochemisch quantifiziert sowie AMPH- bzw. Quinp.-induzierte Beeinflussungen der Quantität und Morphologie synaptischer Dornfortsätze evaluiert.

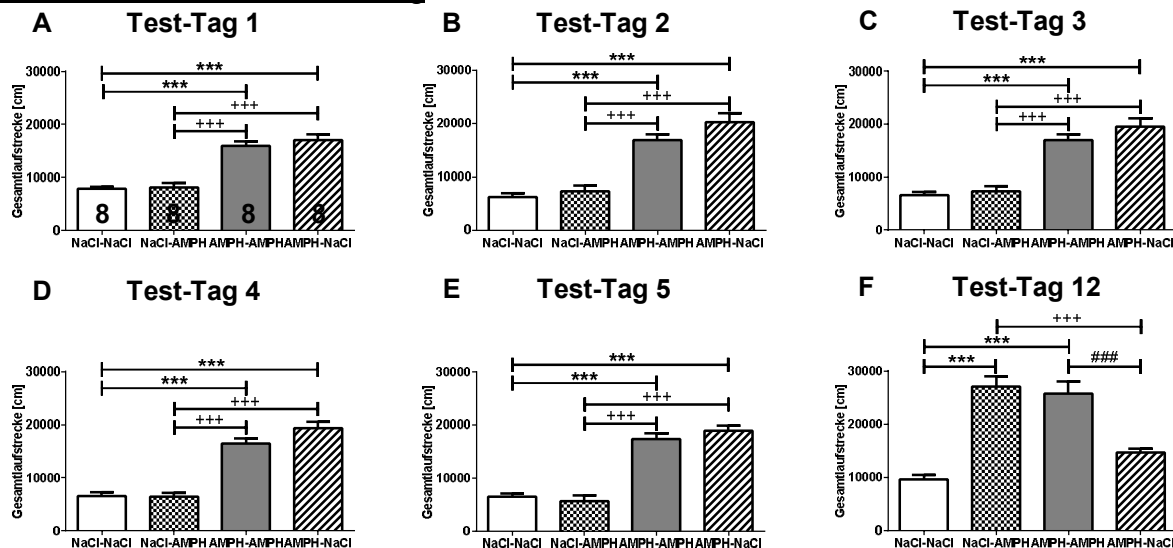
5.5.1.1 Pharmakologische Induktion Schizophrenie-typischer Symptome mittels Amphetamin-Applikation

5.5.1.1.1 Locomotorische Verhaltenssensitivierung nach subchronischer Amphetamin-Behandlung

Zur Überprüfung von Entwicklung und Expression einer AMPH-bedingten lokomotorischen Verhaltenssensitivierung wurde der OF-Test durchgeführt. Folgende Graphiken (Abb. 27) zeigen die je Versuchstag während des OF-Tests zurückgelegten Gesamtlaufstrecken [cm] von männlichen Sprague Dawley-Ratten (neun Wochen) nach akuter sowie subchronischer AMPH-Behandlung im Vergleich zu NaCl-applizierten Kontrollen (s. dazu Abb. 6, Experimentelles Design). Die Gesamtstrecken wurden jeweils in fünfminütigen

Intervallen über die gesamte Test-Laufzeit von 45 min (Tage 1-5) bzw. 60 min (Tag 12) summiert.

Abb. 27: Jeweils zurückgelegte Gesamtlaufstrecke während des Open Field-Tests nach akuter sowie subchronischer AMPH-Behandlung



A-E: Zurückgelegte Laufstrecken [cm] der vier Tiergruppen an den Versuchstagen 1-5, an denen der OF-Test nach Vehikel- bzw. Substanzapplikation über jeweils 45 min hinweg durchgeführt wurde (Entwicklungsphase der lokomotorischen Sensitivierung). F: Zurückgelegte Laufstrecken [cm] der vier Tiergruppen nach einwöchiger Pause an Versuchstag 12, an dem der Challenge-Test, d. h. die Überprüfung des Vorhandenseins der lokomotorischen Sensitivierung, anhand eines 60-minütigen OF-Tests durchgeführt wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Die Ziffern innerhalb der Säulen kennzeichnen die jeweilige Gruppengröße, die für alle Graphen Gültigkeit besitzt. NaCl-NaCl: Kontrollgruppe, Sprague Dawley-Ratten erhielten an allen Testtagen Vehikel-Injektionen (0,9 % Natriumchlorid, NaCl). NaCl-AMPH: akut beim Challenge-Test mit 1 mg/kg KGW d-Amphetaminsulfat (AMPH) behandelte Ratten. AMPH-AMPH: subchronisch sowie beim Challenge-Test mit 1 mg/kg KGW AMPH applizierte Ratten. AMPH-NaCl: subchronisch mit 1 mg/kg KGW AMPH und beim Challenge-Test mit NaCl applizierte Ratten. ***/+++/####: hochsignifikant, $p < 0,0001$.

Wie aus den Graphiken A bis E sowie Tabelle 7 (s. u.) ersichtlich ist, zeigten die Ratten, denen an den aufeinander folgenden Versuchstagen eins bis fünf vor dem 45-minütigen OF-Test NaCl, d. h. Vehikel, verabreicht wurde, den Erwartungen entsprechend ein sehr homogenes Laufverhalten. Diese zwei Tiergruppen (NaCl-NaCl und NaCl-AMPH), legten jeweils am ersten Tag (Abb. 27, A; Tab. 7) mit $7817 \pm 460,1$ cm (NaCl-NaCl) bzw. $8051 \pm 939,2$ cm (NaCl-AMPH) die weiteste Gesamtstrecke zurück, was sich mit einer intensiven Exploration der fremden Umgebung begründen lässt. Ferner differierten die zurückgelegten Gesamtlaufstrecken beider zuvor genannter Tiergruppen hochsignifikant

(*** bzw. +++ $p < 0,0001$, One-way ANOVA, Tukey's Post-hoc Test; s. Abb. 27 A-E) von denen der Ratten, die an den ersten fünf Versuchstagen mit AMPH behandelt wurden (AMPH-AMPH, AMPH-NaCl). Im Gegensatz zu den NaCl-Tieren legten die Nager nach AMPH-Injektion am ersten Tag die geringste Wegstrecke zurück (AMPH-AMPH: $15938 \pm 824,2$ cm, AMPH-NaCl: 17081 ± 1010 cm, vgl. Abb. 27, A und Tab. 7). Während der wiederholten Substanzgabe und sich anschließendem Test im OF über 45 min an den Tagen eins bis fünf verhielten sich die Ratten der beiden AMPH-Gruppen hinsichtlich ihres Laufverhaltens erwartungsgemäß ebenfalls relativ gleichmäßig (A-E). Dennoch fiel im Vergleich zu den Vehikel-applizierten Ratten auf, dass die Tiere der zwei AMPH-Gruppen in ihren Gesamtlaufstrecken stärker voneinander abwichen, was im zweiten OF-Test am deutlichsten erkennbar war (AMPH-AMPH: 16898 ± 1150 cm, AMPH-NaCl: 20323 ± 1659 cm, s. Abb. 27, B; Tab. 7).

Anhand der oben beschriebenen hochsignifikanten Differenz der horizontalen Aktivität zwischen NaCl- und AMPH-behandelten Tieren wird deutlich, dass die subchronische AMPH-Verabreichung eine starke Erhöhung der lokomotorischen Aktivität der Ratten im OF-Test hervorrief (A-E). Auch im letzten 60-minütigen OF-Experiment (F) legten die durchgehend mit AMPH applizierten Tiere (AMPH-AMPH, 25715 ± 2334 cm) verglichen mit den Kontrollen (NaCl-NaCl, $9659 \pm 802,8$ cm) eine hochsignifikant weitere Strecke in der Arena zurück (*** $p < 0,0001$, One-way ANOVA Tukey's Post-hoc Test), wie auch der exemplarischen Darstellung der Gesamtlaufstrecken in Abbildung 28 und Tabelle 7 zu entnehmen ist. Selbst die einmalige AMPH-Injektion am Tag des Challenge-Tests (NaCl-AMPH, s. Abb. 27, F) bedingte einen drastischen Anstieg der Lokomotion. Nach der akuten AMPH-Applikation differierte die Laufstrecke dieser Nager ebenfalls hochsignifikant von der der NaCl-behandelten Kontrollen (NaCl-NaCl: $9659 \pm 802,8$ cm, NaCl-AMPH: 27063 ± 1892 cm; *** $p < 0,0001$, One-way ANOVA, Tukey's Post-hoc Test). Entgegen den Erwartungen bewirkte diese akute AMPH-Gabe eine noch stärkere Hyperlokomotion als die subchronische Behandlung (n. s.). Von dem zugrundeliegenden Versuchsprotokoll ausgehend wurde erwartet, dass die wiederholte AMPH-Applikation an den Versuchstagen eins bis fünf von Tag zu Tag eine Steigerung der Hyperaktivität auslöste. Mit Ausnahme des 4. Versuchstages ließ sich diese Hypothese für die AMPH-AMPH-Gruppe nur minimal bestätigen (Tag 1: $15938 \pm 824,2$ cm, Tag 2: 16898 ± 1150 cm, Tag 3: 16968 ± 1119 cm, Tag 4: 16411 ± 1055 cm, Tag 5: 17305 ± 1139 cm, Tag 12: 25715 ± 2334 cm; vgl. Tab. 7). Für die AMPH-NaCl-Gruppe, die sich gemäß ihrer identischen Behandlung an den ersten fünf Tagen ebenso verhalten sollte, wurde hingegen ab dem

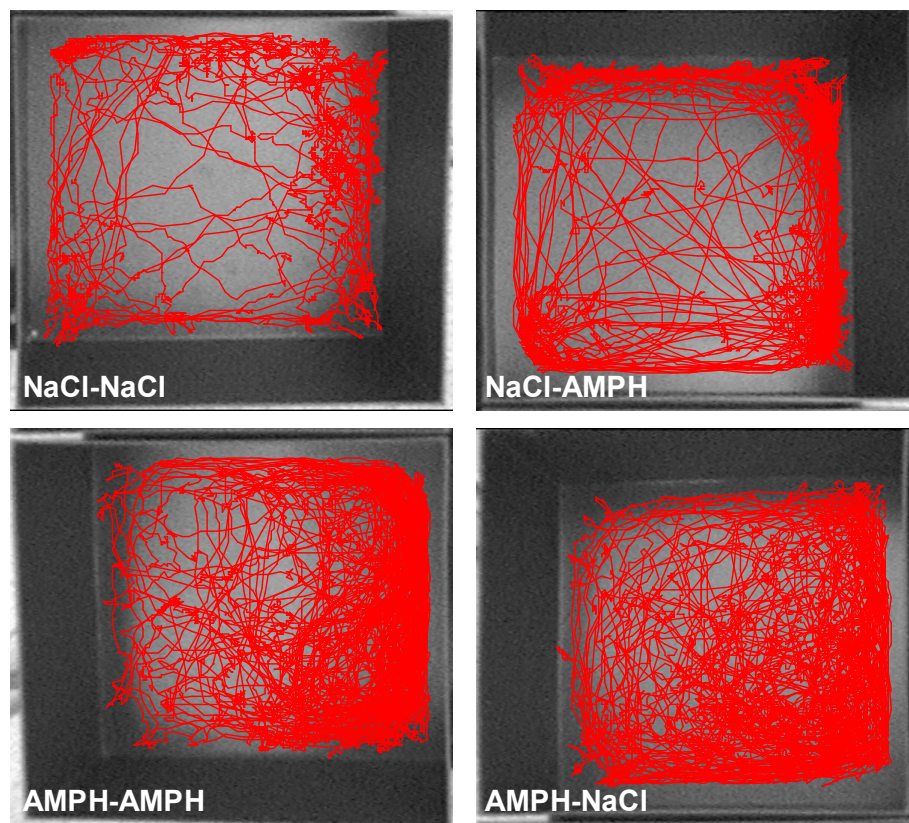
zweiten OF-Test eine täglich sinkende lokomotorische Aktivität festgestellt, die am Challenge-Test ihr Minimum erreichte ($14716 \pm 674,2$ cm). Hier legten die AMPH-NaCl-Ratten eine hochsignifikant (#### $p < 0,0001$, One-way ANOVA, Tukey's Post-hoc Test) geringere Strecke in der OF-Arena zurück als die AMPH-AMPH-Tiere. Während, wie oben erwähnt, zwischen den zuletzt genannten Tieren und denen der NaCl-AMPH-Gruppe am 12. Versuchstag kein nennenswerter Unterschied herrschte, liefen die akut mit AMPH behandelten Nager eine hochsignifikant größere Strecke im OF als die AMPH-NaCl-Ratten (+++ $p < 0,0001$, One-way ANOVA, Tukey's Post-hoc Test). Auf der Grundlage dieser Beobachtungen muss aus dem Verhaltenstest geschlossen werden, dass sich die gewünschte AMPH-induzierte lokomotorische Sensitivierung während der wiederholten Substanzapplikation an den Testtagen eins bis fünf nicht entwickelte und somit anhand des Challenge-Tests nicht verifiziert werden konnte. Dennoch verweist die Gegenüberstellung der lokomotorischen Aktivitäten der AMPH-NaCl- und NaCl-NaCl-Gruppen auf einen positiven Effekt der subchronischen AMPH-Behandlung. Obwohl die AMPH-NaCl-Tiere beim Challenge-Test (F) keine Substanz- sondern eine Vehikel-Injektion erhielten, zeigten sie im Vergleich zu den Kontrollratten (NaCl-NaCl, $9659 \pm 802,8$ cm) weiterhin eine leicht gesteigerte bzw. 1,5-fache Lokomotion ($14716 \pm 674,2$ cm; n. s.; vgl. Abb. 27). Dieser als konditionierte Lokomotion bezeichnete Effekt lässt sich darauf zurückführen, dass die Nager aufgrund der wiederholten Tests der ersten fünf Versuchstage an das OF trainiert waren und den Stimulus der Injektion mit der OF-Umgebung assoziierten. Das bedeutet, die Tiere reagierten mit einer konditionierten lokomotorischen Antwort auf die Kombination aus Injektions- und Umgebungsstimulus, unabhängig davon, ob AMPH oder Vehikel appliziert wurde.

Tab. 7: Übersicht der jeweils zurückgelegten mittleren Gesamtlaufstrecke im Open Field-Test nach akuter bzw. subchronischer Amphetamin-Applikation

Versuchstag	NaCl-NaCl	NaCl-AMPH	AMPH-AMPH	AMPH-NaCl	One-way ANOVA
1	$7817 \pm 460,1$	$8051 \pm 939,2$	$15938 \pm 824,2$	17081 ± 1010	*** $p < 0,0001$
2	$6195 \pm 797,1$	7331 ± 1001	16898 ± 1150	20323 ± 1659	*** $p < 0,0001$
3	$6608 \pm 624,4$	$7347 \pm 970,2$	16968 ± 1119	19511 ± 1517	*** $p < 0,0001$
4	$6538 \pm 778,7$	$6488 \pm 728,6$	16411 ± 1055	19357 ± 1263	*** $p < 0,0001$
5	$6469 \pm 603,5$	5644 ± 1091	17305 ± 1139	$18972 \pm 948,5$	*** $p < 0,0001$
12	$9659 \pm 802,8$	27063 ± 1892	25715 ± 2334	$14716 \pm 674,2$	*** $p < 0,0001$

Tabellarisch zusammengefasst sind die Mittelwerte \pm SEM der Gesamtlaufstrecken [cm] im 45- (Tage 1-5) bzw. 60-minütigen (Tag 12) OF-Test für die Kontrolltiere (NaCl-NaCl, 0,9 % NaCl), die akut beim Challenge-Test mit 1 mg/kg KGW d-Amphetaminsulfat (AMPH) (NaCl-AMPH), die subchronisch sowie beim Challenge-Test mit 1 mg/kg KGW AMPH (AMPH-AMPH) wie auch die subchronisch mit 1 mg/kg KGW AMPH und beim Challenge-Test mit 0,9 % NaCl (AMPH-NaCl) behandelten Ratten an den verschiedenen Testtagen. ***: hochsignifikant, p: Signifikanzniveau.

Abb. 28: Exemplarische Darstellung der Laufstrecke im Open Field-Test nach akuter sowie subchronischer AMPH-Behandlung

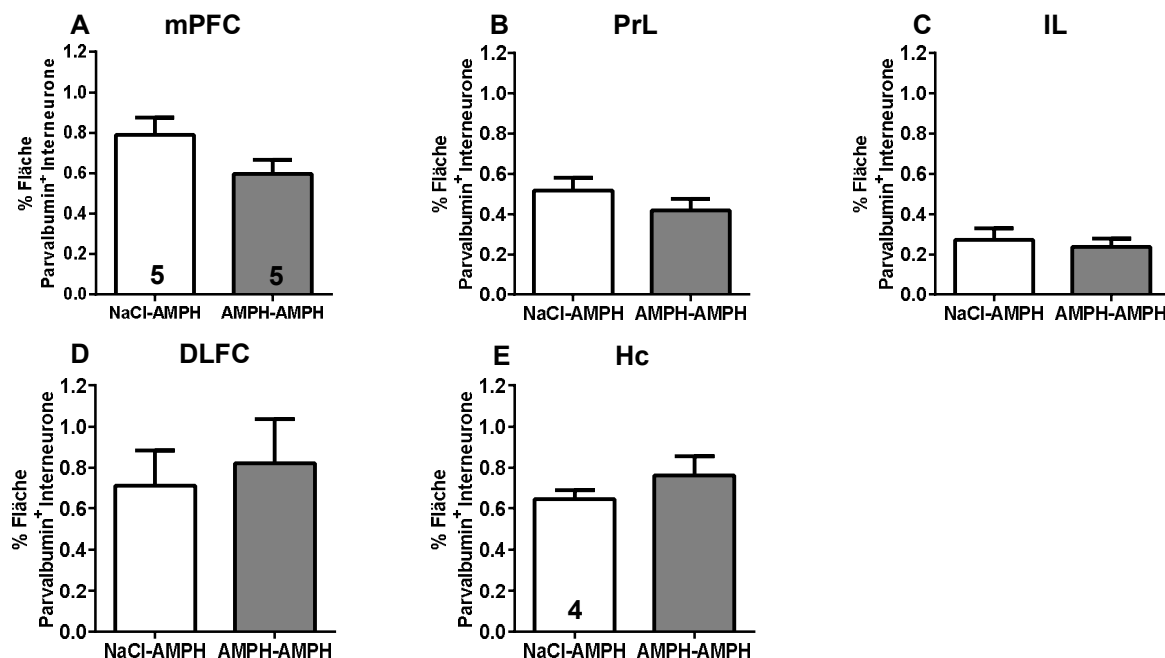


Zu sehen sind die vier OF-Arenen aus der Perspektive der über den Boxen angebrachten Videokamera. In Rot ist jeweils die individuelle Gesamtlaufstrecke eines Tieres je Versuchsgruppe während des 60-minütigen OF-Tests an Versuchstag 12 (Challenge-Test) dargestellt. Das blaue Viereck repräsentiert dabei den jeweiligen Ausgangspunkt des Tieres, als mit der automatischen Aufzeichnung der lokomotorischen Aktivität begonnen wurde. NaCl-NaCl: Kontrollgruppe, Sprague Dawley-Ratten erhielten an allen Testtagen Vehikel-Injektionen (0,9 % NaCl). NaCl-AMPH: akut beim Challenge-Test mit 1 mg/kg KGW AMPH behandelte Ratten. AMPH-AMPH: subchronisch sowie beim Challenge-Test mit 1 mg/kg KGW AMPH applizierte Ratten. AMPH-NaCl: subchronisch mit 1 mg/kg KGW AMPH und beim Challenge-Test mit NaCl applizierte Ratten.

5.5.1.1.2 Quantifizierung kortikaler und hippocampaler PV⁺ Interneurone im Amphetamin-Modell

Um das pharmakologisch induzierte AMPH-Rattenmodell der Schizophrenie auf neuroanatomische Veränderungen zu überprüfen, wurde der prozentuale Anteil der PV-immunreaktiven Interneurone an der jeweils analysierten Gesamtfläche differenter Bereiche des Gehirns nach akuter (NaCl-AMPH) gegenüber subchronischer (AMPH-AMPH) AMPH-Applikation ermittelt. Die Graphiken A bis E der folgenden Abbildung 29 spiegeln die Resultate dieser histologischen Auswertung wider. Die zum mPFC gehörigen Bereiche des PrL und IL wurden einerseits jeweils separat (Abb. 29, B + C), andererseits zusammengefasst als mPFC (A) betrachtet. Darüber hinaus wurden die PV⁺ Interneurone innerhalb des DLFC (D), basierend auf der M1-Region, sowie innerhalb des Hippokampus (Hc; E) quantifiziert (vgl. Abb. 10). Je Gehirnregion und Versuchstier wurden fünf konsekutive Schnitte (8 Serien) der linken Hirnhemisphäre für die histologische Auswertung herangezogen.

Abb. 29: Quantifizierung der PV⁺ Interneurone in kortikalen und subkortikalen Hirnregionen nach akuter bzw. subchronischer AMPH-Behandlung



Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der prozentualen Anteile der PV⁺ Interneurone an der jeweils analysierten Gesamtfläche des medial-präfrontalen Kortex (A; mPFC = PrL + IL) sowie speziell der Subregionen des prälimbischen (B; PrL) und infralimbischen Kortex (C; IL), des dorsolateral-frontalen Kortex (D; DLFC) und des Hippokampus (E; Hc). Die Mittelwerte sind für akut (NaCl-AMPH) sowie subchronisch mit 1 mg/kg KGW AMPH applizierte Sprague Dawley-Ratten (AMPH-AMPH) angegeben. Die Ziffern innerhalb

der Säulen kennzeichnen die jeweilige Gruppengröße, die für alle Graphen Gültigkeit besitzt, wenn nicht anders angegeben.

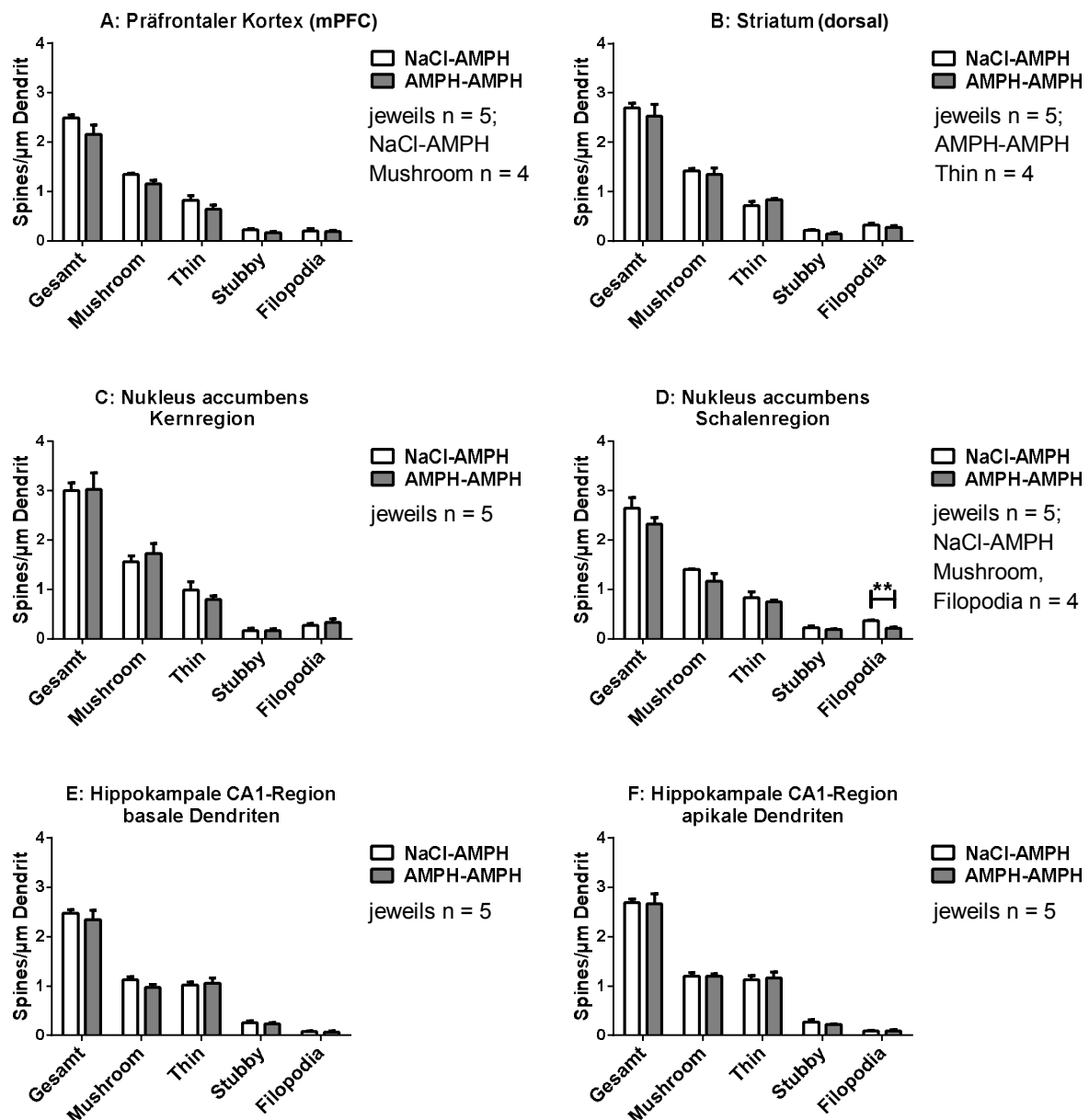
Aus der Quantifizierung der PV⁺ Interneurone resultierten sowohl für die kortikalen Bereiche (Abb. 29, A-D) als auch für das subkortikale Areal des Hippokampus (E) keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den akut (NaCl-AMPH) und subchronisch (AMPH-AMPH) mit AMPH applizierten Ratten (u. z.s. t-Test, $p > 0,05$). Anhand der Daten ist allerdings erkennbar, dass für beide Versuchsgruppen im IL (C) der geringste Anteil PV⁺ Interneurone an der analysierten Gesamtfläche detektiert wurde (NaCl-AMPH: $0,27 \% \pm 0,058 \%$; AMPH-AMPH: $0,24 \% \pm 0,039 \%$). Während für die einmalig mit AMPH behandelten Tiere relativ konstante Werte für die PV⁺ Interneurone im mPFC ($0,79 \% \pm 0,084 \%$), DLFC ($0,71 \% \pm 0,17 \%$) und Hc ($0,65 \% \pm 0,042 \%$) ermittelt wurden, zeigten sich für die Ratten nach subchronischer AMPH-Injektion größere Variationen bezüglich dieser Interneuronpopulationen in den entsprechenden Hirnarealen (mPFC: $0,60 \% \pm 0,068 \%$; DLFC: $0,82 \% \pm 0,22 \%$; Hc: $0,76 \% \pm 0,093 \%$).

5.5.1.1.3 Untersuchung synaptischer Dornfortsätze im Amphetamin-Modell

Neben den zuvor beschriebenen Auswirkungen einer akuten bzw. subchronischen AMPH-Behandlung auf das GABAerge Transmittersystem wurden zudem die Substanz-induzierten Effekte auf die Existenz der synaptischen Dornfortsätze der Pyramidenzellen des mPFC (Abb. 30 + 31, A) wie auch der hippocampalen CA1-Region (CA1, Abb. 30 + 31, E + F) und der MSNs des dorsalen Striatums (STR, Abb. 30 + 31, B) sowie des NAcc (Abb. 30 + 31, C + D) eruiert (vgl. auch Abb. 14). Die Datenerhebung basierte dabei auf der automatisierten Spine-Analyse mittels 3D-Algorithmus (Definiens Architect XD) in Verbindung mit der manuellen Nachklassifizierung nicht erfasster Spines („undefined spines“). Wie schon oben erwähnt, sind der PFC (Hypofrontalität) sowie die hippocampale CA1-Region (Hyperaktivität) stark von der Schizophrenie-typischen Pathologie betroffen, weshalb diese Gehirnregionen für die quantitative und morphologische Spine-Analyse herangezogen wurden. Das Striatum ebenso wie der zum mesolimbischen System zählende NAcc sind für die Expression der lokomotorischen Verhaltenssensitivierung essentielle Hirnstrukturen, in welchen die drei primär in die Schizophrenie-typische Symptomatik involvierten Transmittersysteme (DA, Glutamat, GABA) miteinander interagieren. Neben der Gesamt-Spinedichte wurden auch die Quantitäten der Mushroom, Thin-, Stubby- und Filopodia-Spines pro μm Dendrit für die vier vorher genannten

Gehirnareale ermittelt. Für diese Untersuchung wurde der NAcc in Kern und Schale, die Dendriten der CA1-Pyramidenneurone in basal und apikal differenziert. Sofern möglich, wurden je Hirnregion und Versuchstier zehn distale dendritische Abschnitte der rechten Hemisphäre für die 3D-Spine-Analyse herangezogen. Vor allem im NAcc ließen sich nicht immer zehn geeignete Dendritensegmente identifizieren, weshalb für die Kernregion generell zwischen drei und acht, für die Schalenregion zwischen drei und sieben Dendritenabschnitte fotografiert und ausgewertet werden konnten.

Abb. 30: Quantitäten der Spine-Subtypen auf distalen Dendritensegmenten verschiedener Hirnregionen nach akuter sowie subchronischer AMPH-Behandlung



Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM sowohl der Gesamt-Spinedichte als auch der Quantitäten der vier analysierten Spine-Klassen je μm Dendrit verschiedener Gehirnareale für akut (NaCl-AMPH) gegenüber subchronisch mit 1 mg/kg KGW AMPH applizierten Sprague Dawley-Ratten (AMPH-AMPH). CA1: Cornu Ammonis, Areal 1. **: signifikant, $p = 0,0036$.

Bezugnehmend auf die Gesamt-Spinedichte ([Spines/ μm Dendrit]; Abb. 30, A-F) wurde für keine der analysierten Hirnregionen ein signifikanter Unterschied zwischen den akut und subchronisch mit AMPH behandelten Nagern nachgewiesen (u. z.s. t-Test, $p > 0,05$; vgl. Tab. 8). Für die Schalenregion des NAcc (Abb. 30, D) resultierte jedoch aus der automatischen Detektion der morphologischen Spine-Subtypen (Mushroom, Thin, Stubby, Filopodia) eine signifikante Reduktion der Filopodia-Spines je μm Dendrit nach subchronischer ($0,21 \pm 0,025$) verglichen mit akuter ($0,37 \pm 0,01$) AMPH-Applikation (u. z.s. t-Test, ** $p = 0,0036$). Ferner ergab sich innerhalb des dorsalen Striatums (Abb. 30, B) ein Trend (u. z.s. t-Test, $p = 0,0614$) für eine verringerte Anzahl an Stubby-Spines/ μm Dendrit (Abb. 30, B) in den subchronisch mit AMPH behandelten Tieren ($0,14 \pm 0,027$) gegenüber ihren Kontrollen ($0,21 \pm 0,018$). Des Weiteren wurde im mPFC (Abb. 30, A) tendenziell (u. z.s. t-Test, $p = 0,0719$) eine leichte Abnahme der Mushroom-Spines/ μm Dendrit nach subchronischer ($1,15 \pm 0,074$) im Vergleich zu akuter ($1,34 \pm 0,034$) AMPH-Injektion festgestellt. Für die Kernregion des NAcc (Abb. 30, C) sowie die apikalen (E) und basalen (F) Dendriten in CA1 waren nach der subchronischen Verabreichung von AMPH gegenüber der akuten Gabe keine signifikanten Differenzen in der Quantität der diversen Spine-Klassen nachweisbar ($p > 0,05$, vgl. Tab. 8).

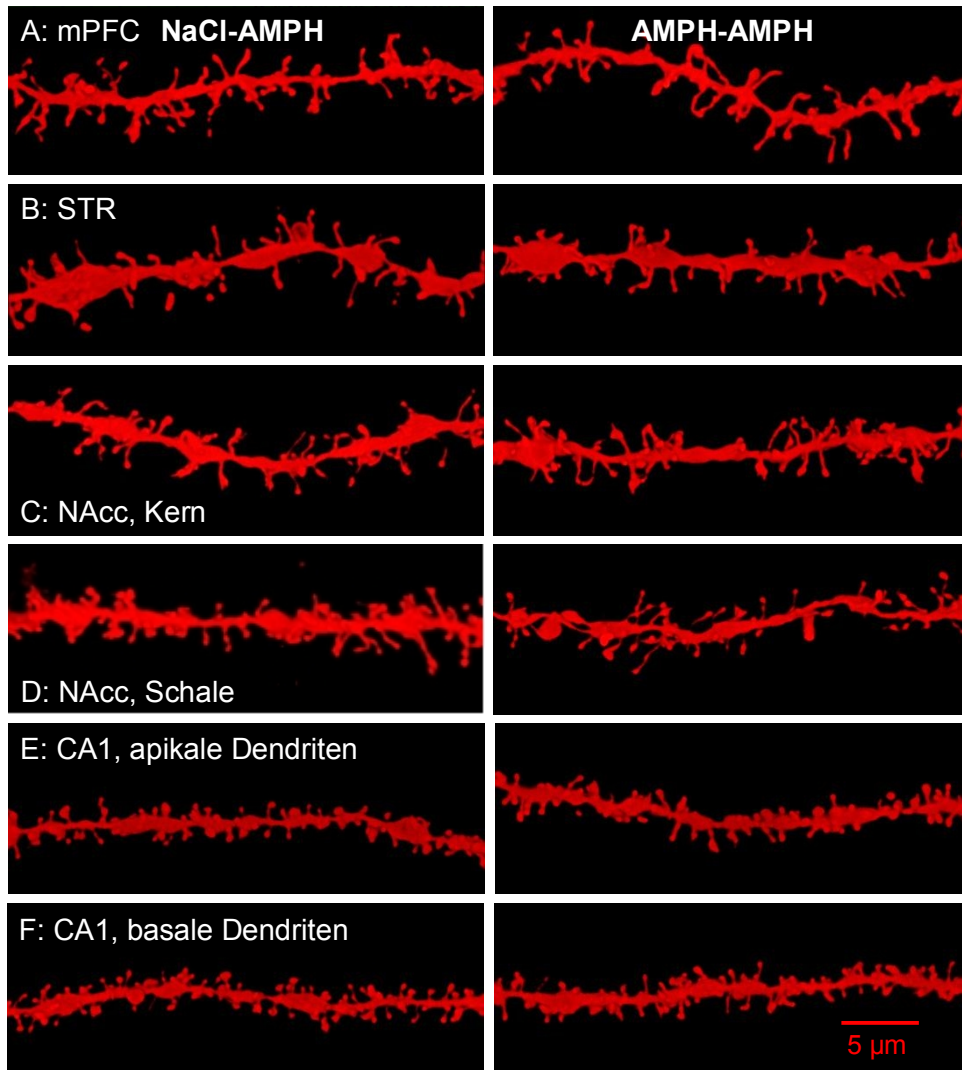
Tab. 8: Zusammenfassung der Mittelwerte \pm SEM, Stichprobengrößen sowie p-Werte der 3D-Spine-Analyse nach akuter bzw. subchronischer AMPH-Behandlung

Hirnregion	Tiergruppe	Gesamt-Spines	Mushroom	Thin	Stubby	Filopodia
mPFC	NaCl- AMPH	2,491 \pm 0,05895 n = 5	1,338 \pm 0,03394 n = 4	0,8170 \pm 0,09590 n = 5	0,2219 \pm 0,02264 n = 5	0,1954 \pm 0,04947 n = 5
	AMPH- AMPH	2,154 \pm 0,1919 n = 5	1,151 \pm 0,07366 n = 5	0,6433 \pm 0,07376 n = 5	0,1626 \pm 0,02051 n = 5	0,1859 \pm 0,02666 n = 5
	p-Werte	0,1314	0,0719	0,1890	0,0881	0,8702
STR	NaCl- AMPH	2,692 \pm 0,1023 n = 5	1,418 \pm 0,04774 n = 5	0,7222 \pm 0,07793 n = 5	0,2136 \pm 0,01801 n = 5	0,3194 \pm 0,04048 n = 5
	AMPH- AMPH	2,529 \pm 0,2383 n = 5	1,346 \pm 0,1302 n = 5	0,8325 \pm 0,03044 n = 4	0,1435 \pm 0,02672 n = 5	0,2816 \pm 0,03321 n = 5
	p-Werte	0,5475	0,6175	0,2710	0,0614	0,4907
NAcc Kern	NaCl- AMPH	3,003 \pm 0,1557 n = 4	1,567 \pm 0,1115 n = 4	0,9804 \pm 0,1694 n = 4	0,1681 \pm 0,03996 n = 4	0,2696 \pm 0,03475 n = 4
	AMPH- AMPH	3,028 \pm 0,3257 n = 4	1,725 \pm 0,2094 n = 4	0,7903 \pm 0,08049 n = 4	0,1584 \pm 0,03508 n = 4	0,3322 \pm 0,06881 n = 4
	p-Werte	0,9477	0,5280	0,3499	0,8615	0,4477
NAcc Schale	NaCl- AMPH	2,641 \pm 0,2126 n = 4	1,401 \pm 0,02058 n = 3	0,8270 \pm 0,1210 n = 4	0,2176 \pm 0,03851 n = 4	0,3666 \pm 0,009916 n = 3
	AMPH- AMPH	2,320 \pm 0,1356 n = 4	1,169 \pm 0,1539 n = 4	0,7471 \pm 0,03684 n = 4	0,1805 \pm 0,01954 n = 4	0,2098 \pm 0,02469 n = 4
	p-Werte	0,2505	0,2608	0,5510	0,4239	0,0036 **
CA1 apikal	NaCl- AMPH	2,696 \pm 0,06903 n = 5	1,207 \pm 0,06615 n = 5	1,124 \pm 0,08732 n = 5	0,2748 \pm 0,03655 n = 5	0,09029 \pm 0,01334 n = 5
	AMPH- AMPH	2,671 \pm 0,1933 n = 5	1,194 \pm 0,05905 n = 5	1,159 \pm 0,1246 n = 5	0,2186 \pm 0,01334 n = 5	0,09090 \pm 0,01875 n = 5
	p-Werte	0,9050	0,8927	0,8275	0,1868	0,9794
CA1 basal	NaCl- AMPH	2,476 \pm 0,07137 n = 5	1,127 \pm 0,06290 n = 5	1,016 \pm 0,05837 n = 5	0,2536 \pm 0,03455 n = 5	0,07406 \pm 0,01485 n = 5
	AMPH- AMPH	2,347 \pm 0,1875 n = 5	0,9768 \pm 0,05593 n = 5	1,057 \pm 0,1027 n = 5	0,2365 \pm 0,01813 n = 5	0,07270 \pm 0,01824 n = 5
	p-Werte	0,5390	0,1131	0,7376	0,6725	0,9553

Tabellarisch zusammengefasst sind die Mittelwerte \pm SEM der 3D-Spinezahlen insgesamt und je untersuchter Spine-Klasse im medial-präfrontalen Kortex (mPFC), Striatum (STR), Nukleus accumbens

(NAcc) sowie in CA1 (Cornu Ammonis, Areal 1) für akut (NaCl-AMPH) bzw. subchronisch mit 1 mg/kg KGW AMPH applizierte Sprague Dawley-Ratten (AMPH-AMPH). n: jeweilige Gruppengröße, p: Signifikanzniveau.

Abb. 31: Beispielhafte Exemplare Dil-markierter, distaler Dendritensegmente akut sowie subchronisch mit AMPH behandelter Sprague Dawley-Ratten



Zweidimensional abgebildet sind hier Beispiele Dil-markierter, distaler Dendritensegmente mit Spines des medial-präfrontalen Kortex (A; mPFC), des dorsalen Striatums (B; STR), Nukleus accumbens (C + D; NAcc) sowie CA1 (E + F; Cornu Ammonis, Areal 1) von akut (NaCl-AMPH, linksseitige Fotos) bzw. subchronisch (AMPH-AMPH, rechtsseitige Fotos) mit 1 mg/kg KGW AMPH behandelten Ratten. Exemplarische Filopodia-Spine-Zahlen der ausgewerteten Original-3D-Bildstapel der Fotos D: 0,45 Filopodia-Spines/ μm (NaCl-AMPH); 0,19 Filopodia-Spines/ μm (AMPH-AMPH). Maßstab: 5 μm .

Die Fotos voranstehender Abbildung 31 zeigen exemplarisch distale Dendritensegmente der Pyramidenneurone des mPFC (A), der MSNs des dorsalen Striatums (B) sowie der Kern- und Schalenregion des NAcc (C + D) und der CA1-Pyramidenneurone des Hippokampus (apikale und basale Dendriten, E + F), die unter Einsatz der Gene Gun mit

dem rot-fluoreszierenden Carbocyanin-Farbstoff Dil markiert wurden. Die Fotos wurden mit Hilfe eines konfokalen LSM dreidimensional aufgenommen, sind jedoch in obiger Abbildung nur zweidimensional dargestellt. In Übereinstimmung mit der statistischen Auswertung fallen bei makroskopischer Betrachtung der Fotos keine nennenswerten Differenzen zwischen den zwei unterschiedlichen Versuchstiergruppen auf. Was allerdings aus dem Vergleich der Dendritensegmente der diversen Hirnareale deutlich wurde, war, dass die Morphologie der synaptischen Dornfortsätze der verschiedenen Gehirnstrukturen variierte. Die Spines der in CA1 lokalisierten Dendriten (Abb. 31, E + F) waren gegenüber den Dornfortsätzen, die sich auf den Dendriten der übrigen analysierten Hirnregionen (A - D) befanden, erkennbar kleiner; zudem handelte es sich vorrangig um Thin- und Mushroom-Spines. Einerseits wiesen die apikalen (E) und basalen (F) hippokampalen Dendriten deutlich mehr Thin-Spines auf als alle anderen untersuchten Zellfortsätze (vgl. Tab. 8), andererseits lag die Quantität der Filopodia-Spines der CA1-Dendriten um das Zwei- bis Fünffache unter der Dichte dieser Spine-Klasse, die für die vier weiteren Hirnareale ermittelt wurde (s. Tab. 8). Was außerdem bei der manuellen Nachklassifizierung der nicht automatisch von der Definiens Architect XD-Software einer Spine-Klasse zugeordneten Dornfortsätze („undefined spines“) beobachtet wurde, war, dass sich auf den Dendriten der CA1-Region die geringste Anzahl dieser nicht klassifizierten Spines befand.

5.5.1.1.4 Korrelation zwischen automatisierter 2D- und 3D-Spine-Analyse im Amphetamin-Modell

Neben der zuvor erläuterten automatischen 3D-Spine-Quantifizierung und -Klassifizierung wurde die Anzahl der synaptischen Dornfortsätze auch mittels des Software-gesteuerten 2D-Verfahrens erfasst. Die Resultate der 2D-Spine-Evaluation sollen hier nicht im Detail besprochen werden, da diese primär für die Validierung der 3D-Methode, d. h. für die im Folgenden erläuterte statistische Korrelationsanalyse der 2D- und 3D-Spine-Daten, benötigt wurden. Die dreidimensionale Auswertung ist oben unter Punkt 5.5.1.1.3 ausführlich beschrieben.

Unter Anwendung der statistischen Korrelationsanalyse wurde überprüft, ob die beiden automatisierten Verfahren der Spine-Evaluation, für welche die Definiens Architect XD-Analysesoftware herangezogen wurde, konforme Ergebnisse lieferten, d. h. ob ein linearer Zusammenhang zwischen den Resultaten vorlag. Die Ziele dieser Untersuchung waren

zum einen die Verifizierung der Software-gesteuerten 3D-Auswertung der synaptischen Dornfortsätze für diverse Gehirnregionen, zum anderen die Ratifizierung der Praktikabilität dieser Methode in einem pharmakologisch induzierten, präklinischen Rattenmodell der Schizophrenie. Dazu wurden die mittels zwei- bzw. dreidimensionaler automatischer Auswertung gewonnenen Daten auf Basis der parametrischen Korrelationsanalyse nach Pearson miteinander in Verbindung gebracht. Diese statistische Beurteilung, deren Erkenntnisse in den nachstehenden Tabellen 9 und 10 aufgeführt sind, wurde einerseits für die akut (Tab. 9), andererseits für die subchronisch (Tab. 10) mit AMPH behandelten Ratten vorgenommen. Darüber hinaus wurden für beide Versuchstiergruppen die Gesamt-Spinedichten der 2D- und 3D-Spine-Analyse sowohl für alle evaluierten Hirnareale separat als auch in ihrer Gesamtheit betrachtet.

Abgesehen von den apikalen Dendriten der CA1-Pyramidenzellen (n. s.) konnten für die akute Behandlungsgruppe (s. Tab. 9) in allen untersuchten Gehirnarealen mindestens signifikante Korrelationen (* $p < 0,05$) zwischen den Daten der 2D- und 3D-Spine-Analyse detektiert werden. Die subchronisch mit AMPH applizierten Ratten betreffend (vgl. Tab. 10) wurden ebenfalls für alle Hirnregionen starke lineare Zusammenhänge zwischen den zwei- und dreidimensionalen Spinezahlen festgestellt. Bezüglich der subchronisch behandelten Tiergruppe korrelierten die Ergebnisse beider Spineanalyse-Verfahren mehrheitlich deutlich stärker, d. h. überwiegend hochsignifikant (Tab. 10; *** $p < 0,0001$), verglichen mit den einmalig mit AMPH injizierten Tieren (Tab. 9), was außerdem durch die relativ hohen Korrelationskoeffizienten (r) unterstrichen wird. Ferner ist anhand der r -Werte erkennbar, dass es sich ausschließlich um positive lineare Zusammenhänge zwischen den 2D- und 3D-Daten handelt. Das bedeutet, je größer die Spinedichte/ μm Dendrit gemäß automatisierter 2D-Auswertung war, desto größer war auch die Spine-Quantität, die aus der Software-gestützten 3D-Evaluation resultierte. Die Aussagen der Korrelationsanalyse zeigen, dass beide Methoden der automatisierten Spine-Erfassung übereinstimmende Ergebnisse lieferten, wodurch nicht nur die auf der Definiens-Software beruhende 3D-Spine-Analyse verifiziert werden konnte, sondern sich auch deren Anwendbarkeit auf diverse Areale des Gehirns sowie verschiedene Tiermodelle (hier: Schizophrenie; vgl. Abschnitte 5.3 + 5.4: Morbus Alzheimer) bestätigte.

Tab. 9: Resultate der Korrelationsanalyse der 2D- und 3D-Spinedichten nach akuter Amphetamin-Behandlung

Hirnregion	Anzahl korrelierter 2D- und 3D-Werte	Korrelationskoeffizient nach Pearson (r)	t-Test
mPFC	39	0,6334	*** p < 0,0001
STR	51	0,4396	** p = 0,0012
NAcc Kern	19	0,6520	** p = 0,0025
NAcc Schale	17	0,4961	* p = 0,0428
CA1, apikale Dendriten	50	0,2200	n. s. p = 0,1248
CA1, basale Dendriten	50	0,4670	*** p = 0,0006
insgesamt (alle Hirnregionen)	226	0,4406	*** p < 0,0001

Tab. 10: Resultate der Korrelationsanalyse der 2D- und 3D-Spinedichten nach subchronischer Amphetamin-Behandlung

Hirnregion	Anzahl korrelierter 2D- und 3D-Werte	Korrelationskoeffizient nach Pearson (r)	t-Test
mPFC	43	0,5806	*** p < 0,0001
STR	42	0,6715	*** p < 0,0001
NAcc Kern	18	0,5491	* p = 0,0183
NAcc Schale	18	0,6849	** p = 0,0017
CA1, apikale Dendriten	49	0,7007	*** p < 0,0001
CA1, basale Dendriten	49	0,5858	*** p < 0,0001
insgesamt (alle Hirnregionen)	219	0,6213	*** p < 0,0001

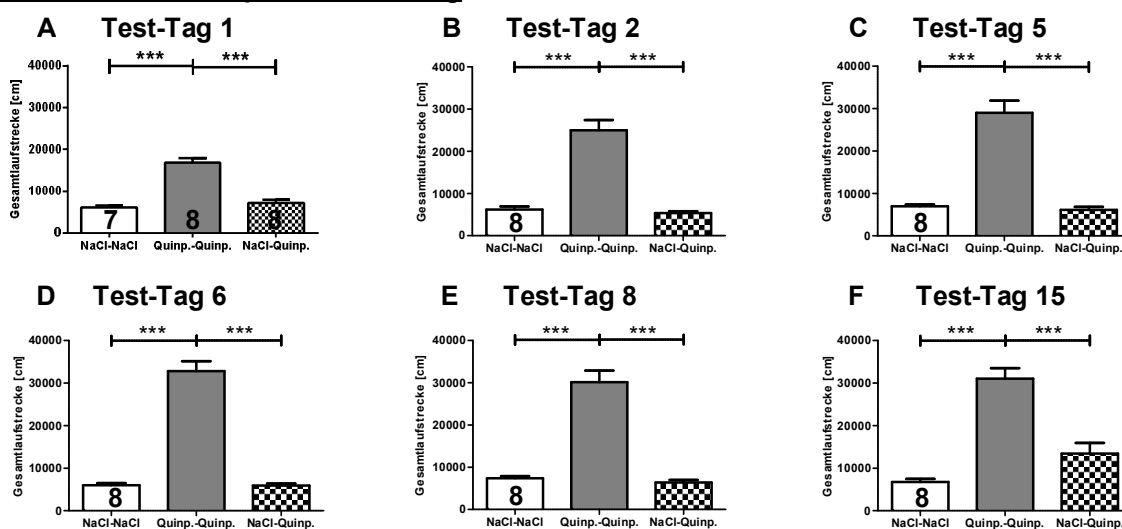
Jeweils tabellarisch zusammengefasst sind die Ergebnisse der statistischen Korrelationsanalyse zwischen 2D- und 3D-Spinezahlen, die für akut (NaCl-AMPH) sowie subchronisch mit 1 mg/kg KGW AMPH applizierte Ratten (AMPH-AMPH) im medial-präfrontalen Kortex (mPFC), dorsalen Striatum (STR), Nukleus accumbens (NAcc) sowie in CA1 (Cornu Ammonis, Areal 1) ermittelt wurden. n. s.: nicht signifikant, *, **: signifikant, ***: hochsignifikant.

5.5.1.2 Pharmakologische Induktion Schizophrenie-typischer Symptome mittels Quinpirol-Applikation

5.5.1.2.1 Lokomotorische Verhaltenssensitivierung nach subchronischer Quinpirol-Behandlung

Analog zur vorhergehend erläuterten AMPH-Studie fand der OF-Test auch im Rahmen der pharmakologischen Induktion Schizophrenie-typischer Symptome mittels Quinp.-Behandlung Anwendung (vgl. Abb. 7, Experimentelles Design), um die Versuchstiere auf eine Quinp.-bedingte Hyperlokomotion hin zu testen. Die Diagramme der nachstehenden Abbildung 32 repräsentieren die je Versuchstag während des OF-Tests zurückgelegten Gesamtlaufstrecken [cm] von männlichen, Sprague Dawley-Ratten (neun Wochen) nach akuter sowie subchronischer Quinp.-Gabe im Vergleich zu Vehikel-Kontrollen. Die Gesamtstrecken wurden jeweils in fünfminütigen Intervallen über die gesamte Test-Laufzeit von 90 min summiert.

Abb. 32: Jeweils zurückgelegte Gesamtlaufstrecke während des Open Field-Tests nach akuter sowie subchronischer Quinpirol-Behandlung



A-E: Zurückgelegte Laufstrecken [cm] der drei Tiergruppen an den Versuchstagen 1, 2, 5, 6 und 8, an denen der Open Field-Test nach Vehikel- bzw. Substanzapplikation über jeweils 90 min hinweg durchgeführt wurde (Entwicklungsphase der lokomotorischen Sensitivierung). F: Zurückgelegte Laufstrecken [cm] der drei Tiergruppen nach einwöchiger Pause an Versuchstag 15, an dem der Challenge-Test, d. h. die Überprüfung des Vorhandenseins der lokomotorischen Sensitivierung, anhand eines 90-minütigen OF-Tests durchgeführt wurde. ***: hochsignifikant. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Die Ziffern innerhalb der Säulen kennzeichnen die jeweilige Gruppengröße, die für alle Graphen Gültigkeit besitzt, wenn nicht anders angegeben. NaCl-NaCl: Kontrollgruppe, Sprague Dawley-Ratten erhielten an allen Testtagen Vehikel-Injektionen (0,9 % NaCl). Quinp.-Quinp.: subchronisch sowie beim Challenge-Test mit 0,25 mg/kg KGW

Quinpirolhydrochlorid (Quinp.) applizierte Ratten. NaCl-Quinp.: akut beim Challenge-Test mit 0,25 mg/kg KGW Quinpirol behandelte Ratten.

Aus den Graphen A bis E sowie Tabelle 11 (s. u.) geht hervor, dass die Tiere der beiden Gruppen, die an den Versuchstagen 1 (A), 2 (B), 5 (C), 6 (D) und 8 (E) NaCl appliziert bekamen, erwartungsgemäß ein sehr homogenes Laufverhalten zeigten. Sie legten in jedem Test, d. h. innerhalb von je 90 Minuten, durchschnittlich ca. 6.500 cm in der OF-Arena zurück und waren damit an allen Testtagen etwa gleichbleibend lokomotorisch aktiv (s. Tab. 11). Entgegengesetzt dazu bewirkte die Injektion von Quinp. die erwartete lokomotorische Hyperaktivität, was dadurch bestätigt wird, dass die Ratten nach Quinp.-Gabe in der Summe die ~2,6- (A; $16859 \pm 978,4$ cm) bzw. bis zu ~5-fache (D; 32787 ± 2340 cm) Strecke verglichen mit den NaCl-applizierten Nagern im OF zurücklegten. Folglich wich die summierte Gesamtlaufstrecke der Quinp.-Tiere an allen fünf Testtagen (A-E) hochsignifikant ($*** p < 0,001$, One-way ANOVA, Tukey's Post-hoc Test) von der der NaCl-Tiere ab (vgl. Tab. 11). Abgesehen vom achten Tag des Experiments (E), an dem ein geringfügiger Rückgang der Quinp.-induzierten Hyperlokomotion beobachtet wurde, ist aus den Diagrammen A-D wie auch der Tabelle 11 ersichtlich, dass die Quinp.-induzierte Hyperaktivität von Versuchstag zu Versuchstag schrittweise zunahm. Dieses Resultat verdeutlicht die erfolgreiche Entwicklung der Quinp.-induzierten lokomotorischen Sensitivierung während der wiederholten Tests im OF an den Versuchstagen 1, 2, 5, 6 und 8 (A-E). Die intermittierende Gabe von Quinp. bedingte eine Veränderung der Substanzwirkung, nämlich eine Steigerung der Effekte (= Sensitivierung). Es kam zu einer Verstärkung des Quinp.-assoziierten Verhaltens, d. h. zu einer Zunahme der Reaktionsstärke der entsprechenden Tiere, was durch die ansteigende lokomotorische Aktivität repräsentiert wird. Das positive Ergebnis der Verhaltenssensitivierung lässt sich dadurch untermauern, dass nach einer einwöchigen Unterbrechung die erneute Verabreichung von Quinp. an Versuchstag 15 weiterhin zu einer hochsignifikant ($*** p < 0,001$, One-way ANOVA, Tukey's Post-hoc Test) erhöhten Lokomotion der betreffenden Ratten gegenüber den Kontrolltieren führte (Challenge-Test, Abb. 32, F und Abb. 33). Des Weiteren ist anhand der Graphik F (Abb. 32) sowie der exemplarischen Darstellung der Gesamtlaufstrecken in Abbildung 33 der akute Quinp.-Effekt erkennbar. Selbst die einmalige Applikation der Substanz am Tag des Challenge-Tests (F) löste bei den korrespondierenden NaCl-Quinp.-Tieren (13423 ± 2501 cm) im Vergleich zu den NaCl-NaCl-Kontrollen ($6763 \pm 731,5$ cm), eine gesteigerte horizontale Aktivität aus

($p > 0,05$, n. s., One-way ANOVA, Tukey's Post-hoc Test). Den Erwartungen entsprechend war der akute Quinp.-Effekt jedoch deutlich geringer als die Hyperlokomotion nach subchronischer Quinp.-Injektion (31013 ± 2465 cm; *** $p < 0,001$, One-way ANOVA, Tukey's Post-hoc Test).

Tab. 11: Übersicht der jeweils zurückgelegten mittleren Gesamtlaufstrecke im Open Field-Test nach akuter bzw. subchronischer Quinpirol-Applikation

Versuchstag	NaCl-NaCl	Quinp.-Quinp.	NaCl-Quinp.	One-way ANOVA
1	$6137 \pm 459,3$	$16859 \pm 978,4$	$7154 \pm 799,3$	*** $p < 0,0001$
2	$6197 \pm 711,3$	24946 ± 2421	$5336 \pm 461,4$	*** $p < 0,0001$
5	$6965 \pm 430,2$	28983 ± 2860	$6110 \pm 709,9$	*** $p < 0,0001$
6	$5979 \pm 495,3$	32787 ± 2340	$5926 \pm 458,1$	*** $p < 0,0001$
8	$7370 \pm 499,1$	30116 ± 2738	$6383 \pm 600,8$	*** $p < 0,0001$
15	$6763 \pm 731,5$	31013 ± 2465	13423 ± 2501	*** $p < 0,0001$

Tabellarisch zusammengefasst sind die Mittelwerte \pm SEM der Gesamtlaufstrecken [cm] im 90-minütigen OF-Test für die Kontrolltiere (NaCl-NaCl, 0,9 % NaCl) sowie die subchronisch (Quinp.-Quinp.) und akut (NaCl-Quinp.) mit 0,25 mg/kg KGW Quinpirol applizierten Ratten an den verschiedenen Testtagen. ***: hochsignifikant, p: Signifikanzniveau.

Abb. 33: Exemplarische Darstellung der Laufstrecke im Open Field-Test nach akuter sowie subchronischer Quinpirol-Behandlung

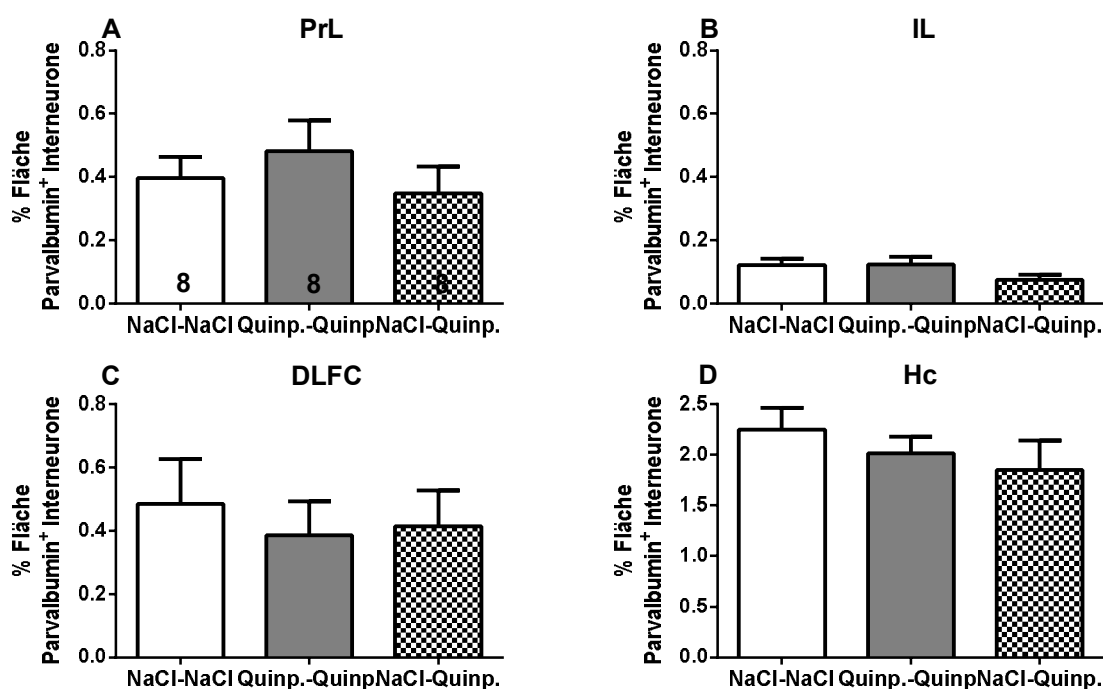


Abgebildet sind die drei OF-Arenen aus der Perspektive der über den Boxen angebrachten Videokamera. In Rot ist jeweils die individuelle Gesamtlaufstrecke eines Tieres je Versuchsgruppe während des 90-minütigen OF-Tests an Versuchstag 15 (Challenge-Test) dargestellt. Das blaue Viereck repräsentiert dabei den jeweiligen Ausgangspunkt des Tieres, als mit der automatischen Aufzeichnung der lokomotorischen Aktivität begonnen wurde. NaCl-NaCl: Kontrolltiere (0,9 % NaCl). NaCl-Quinp.: akut, Quinp.-Quinp.: subchronisch beim Challenge-Test mit 0,25 mg/kg KGW Quinpirol applizierte Sprague Dawley-Ratten.

5.5.1.2.2 Quantifizierung kortikaler und hippocampaler PV⁺ Interneurone im Quinpirol-Modell

Der Durchführung der AMPH-Studie entsprechend (s. o.) wurde auch das pharmakologisch induzierte Quinp.-Tiermodell der Schizophrenie auf ein für die humane Erkrankung typisches Defizit der GABAergen PV⁺ Interneuronpopulationen untersucht. Dazu wurde immunhistochemisch der prozentuale Anteil PV-haltiger Interneurone an der jeweils analysierten Gesamtfläche der in Abbildung 10 dargestellten Gehirnareale bestimmt, die bei Schizophrenie-Patienten besonders stark von den pathologischen Veränderungen innerhalb des GABAergen Transmittersystems betroffen sind. Dabei handelt es sich um PrL (Abb. 34, A), IL (B) und DLFC (C) sowie den Hippokampus (Hc; D) in akut (NaCl-Quinp.) bzw. subchronisch (Quinp.-Quinp.) mit Quinp. behandelten Ratten gegenüber Vehikel-Kontrollen (NaCl-NaCl). Für die Quantifizierung der PV⁺ Interneurone des mPFC wurden PrL (A) und IL (B) herangezogen; die Analyse des DLFC basierte auf der Region M1 (C). Je Gehirnregion und Versuchstier wurden bis auf zwei Ausnahmen, bei denen für PrL und IL je nur vier bzw. für Hc drei Schnitte verfügbar waren, fünf konsekutive Schnitte (6 Serien) der linken Hirnhemisphäre für die histologische Auswertung herangezogen.

Abb. 34: Quantifizierung der PV⁺ Interneurone in kortikalen und subkortikalen Hirnregionen nach akuter sowie subchronischer Quinpirol-Behandlung



Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der prozentualen Anteile der PV⁺ Interneurone an der jeweils

analysierten Gesamtfläche des prälimbischen (A; PrL), infralimbischen (B; IL) und dorsolateral-frontalen Kortex (C; DLFC) sowie des Hippokampus (D; Hc) für die Kontrolltiere (NaCl-NaCl, 0,9 % NaCl) und die akut (NaCl-Quinp.) bzw. subchronisch (Quinp.-Quinp.) mit 0,25 mg/kg KGW Quinpirol applizierten Sprague Dawley-Ratten. Die Ziffern innerhalb der Säulen kennzeichnen die jeweilige Gruppengröße, die für alle Graphen Gültigkeit besitzt.

Die quantitative Bestimmung der PV⁺ Interneurone lieferte weder für die drei untersuchten kortikalen Areale (Abb. 34, A-C) noch für das hippocampale Gebiet (Abb. 34, D) signifikante Unterschiede zwischen den akut (NaCl-Quinp.) bzw. subchronisch (Quinp.-Quinp.) mit Quinp. behandelten Nagern und den Kontrolltieren (NaCl-NaCl), welche entsprechende NaCl-Applikationen erhielten (One-way ANOVA, Tukey's Post-hoc Test, $p > 0,05$). Die Graphiken machen jedoch deutlich, dass für alle drei Versuchstiergruppen der geringste Anteil PV⁺ Interneurone im IL nachgewiesen wurde (B; NaCl-NaCl: 0,121 % \pm 0,021 %, Quinp.-Quinp.: 0,124 % \pm 0,024 %, NaCl-Quinp.: 0,075 % \pm 0,018 %), während der Hippokampus den jeweils höchsten Anteil aufwies (D; NaCl-NaCl: 2,25 % \pm 0,21 %, Quinp.-Quinp.: 2,02 % \pm 0,17 %, NaCl-Quinp.: 1,85 % \pm 0,29 %).

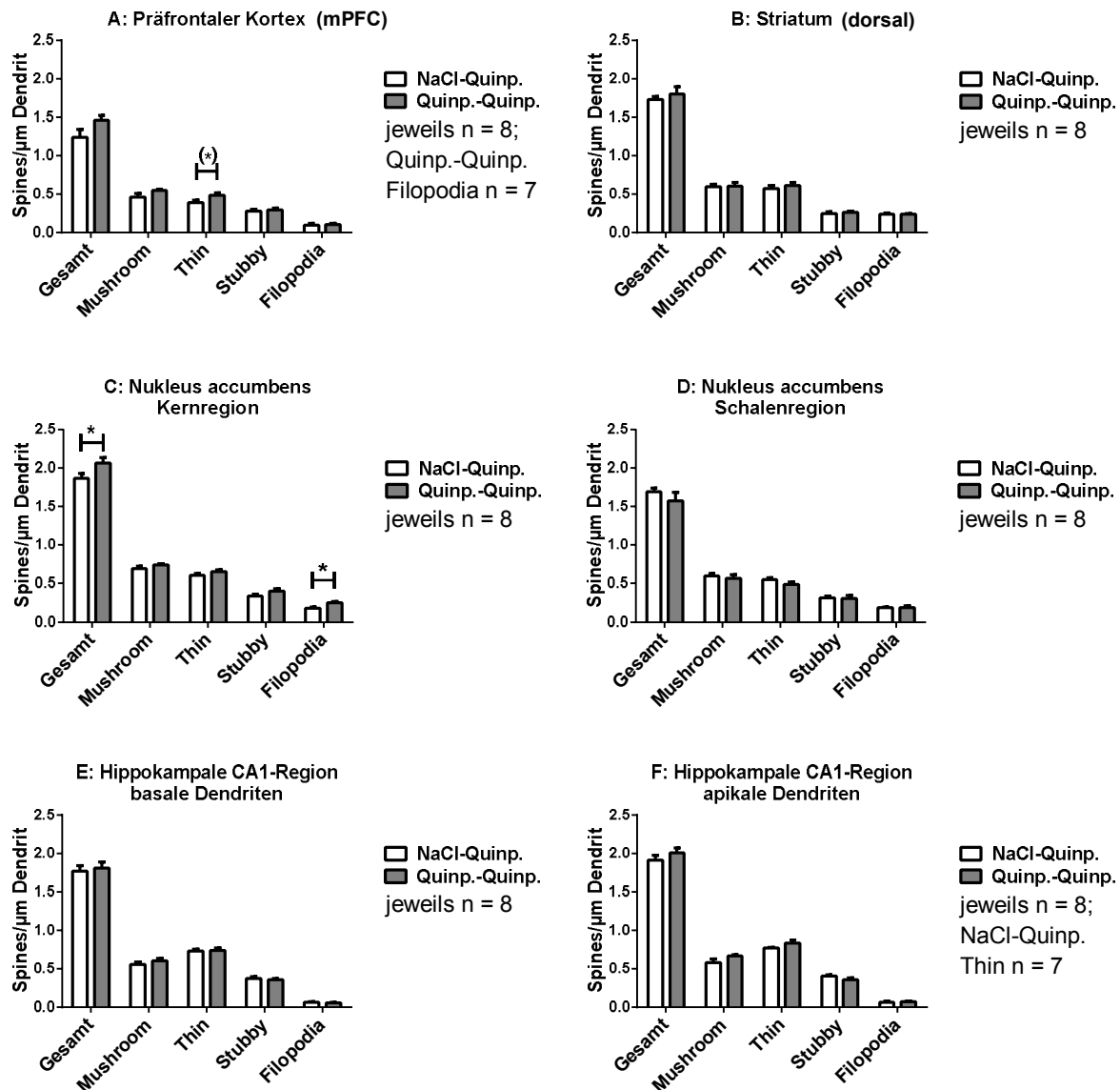
5.5.1.2.3 Untersuchung synaptischer Dornfortsätze im Quinpirol-Modell

Für die Quinpirol-Studie wurde im Vergleich zum AMPH-Versuch ein optimierter 3D-Algorithmus für die automatisierte Spine-Analyse eingesetzt, in welchen nun Hirnregion-spezifische Adaptationen integriert waren, die eine noch präzisere morphologische Differenzierung der Spines in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation gewährleisteten. Anhand stichprobenhafter manueller Messungen wurden die durchschnittlichen Minimal- und Maximalwerte der Spine-Länge und des Kopf-Durchmessers der verschiedenen Spine-Subtypen in den diversen Gehirnregionen ermittelt und die Zugehörigkeitswerte (Länge, Kopf-Durchmesser) einzelner Spine-Klassen in der Software entsprechend angeglichen. Während sich die Spine-Subtypen präfrontaler und hippocampaler Pyramidenneurone sowie accumbaler MSNs in ihrer Morphologie, mit Ausnahme der Thin-Spines, nicht unterschieden und demnach auf Basis identischer Zugehörigkeitswerte klassifiziert wurden, mussten für die Spines der striatalen MSNs einige Anpassungen vorgenommen werden. Diese verwiesen auf im Vergleich zu den übrigen hier evaluierten Gehirnbereichen größere Mushroom- wie auch Filopodia-Spines im Striatum. Die Thin-Spines zeigten sonst als einziger Subtyp eine geringe Variation auf den Dendriten unterschiedlicher Hirnregionen. Während sie im PFC und NAcc mit einer maximalen Länge von 1,0 μm am

längsten und in CA1 mit 0,75 μm am kürzesten waren, wichen die Thin-Spines striataler Dendriten mit maximal 0,8 μm nur unerheblich von dem zuletzt genannten Wert ab. Für die Umstellung der Analyse von Maus auf Ratte waren nur minimale Anpassungen der Zugehörigkeitswerte einzelner Spine-Klassen nötig, was darauf hinweist, dass zwischen den beiden Spezies keine wesentlichen Unterschiede in der Spine-Morphologie zu existieren scheinen. Primär wurde die maximale Länge der Mushroom-Spines (für alle Hirnregionen) von 1,0 μm (Maus) auf 3,0 μm (Ratte) angehoben.

Der optimierte 3D-Algorithmus fand für die automatisierte Detektion möglicher Quinp.-induzierter Effekte auf die Quantität und Morphologie der dendritischen Spines Anwendung. Die als Dornfortsätze undefinierter Morphologie („undefined spines“) eingeordneten Spines wurden manuell nachklassifiziert. Die Evaluation, deren Resultate in nachstehender Abbildung 35 zu sehen sind, bezog sich dabei einerseits auf die Dendriten der medial-präfrontal (mPFC, Abb. 35 + 36, A) sowie hippocampal (CA1, Abb. 35, E + F) lokalisierten Pyramidenzellen, andererseits auf die Zellfortsätze der striatalen (STR, Abb. 35, B) und accumbalen (NAcc, Abb. 35, C + D; Abb. 36, B) MSNs (s. auch Abb. 14). Generell wurden distale Dendritensegmente in akut (NaCl-Quinp.) und subchronisch (Quinp.-Quinp.) mit Quinp. behandelten Ratten sowohl auf ihre Gesamt-Spinedichte als auch auf die Quantitäten der Mushroom-, Thin-, Stubby- und Filopodia-Spines pro μm Dendrit untersucht. Dabei wurden Kern- und Schalenregion des NAcc (Abb. 35, C + D; Abb. 36, B) wie auch apikale und basale Dendriten der Pyramidenzellen in CA1 (Abb. 35, E + F) differenziert betrachtet. Pro Areal und Versuchstier wurden acht bis zehn distale dendritische Abschnitte der rechten Hirnhemisphäre für die 3D-Spine-Analyse herangezogen. In einem Fall konnten für die Schalenregion des NAcc jedoch nur fünf Segmente fotografiert und ausgewertet werden. Beispielhafte Exemplare Dil-markierter, distaler Dendritensegmente derjenigen Gehirnareale, in denen nach subchronischer gegenüber akuter Quinp.-Behandlung signifikante Veränderungen mindestens eines Spine-Subtyps oder der Gesamt-Spinedichte ermittelt wurden, sind im Anschluss an die statistische Darstellung abgebildet (Abb. 36).

Abb. 35: Quantitäten der Spine-Subtypen auf distalen Dendritensegmenten verschiedener Hirnregionen nach akuter sowie subchronischer Quinpirol-Behandlung



Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM sowohl der Gesamt-Spinedichte als auch der Quantitäten der vier analysierten Spine-Klassen je μm Dendrit verschiedener Gehirnnareale für akut (NaCl-Quinip.) gegenüber subchronisch mit 0,25 mg/kg KGW Quinpirol applizierten Sprague Dawley-Ratten (Quinip.-Quinip.). CA1: Cornu Ammonis, Areal 1. *: signifikant, $p = 0,0464$ (NAcc gesamt) bzw. $p = 0,0135$ (NAcc Filopodia), (*): starker Trend ($p = 0,0525$).

Hinsichtlich der Gesamt-Spinedichte [Spines/ μm Dendrit] wurde für die Kernregion des NAcc (Abb. 35, C und Abb. 36, B) ein signifikanter Anstieg der gesamten Spineanzahl nach subchronischer (Quinip.-Quinip., $2,07 \pm 0,067$ Spines/ μm Dendrit) verglichen mit akuter Quinip.-Behandlung (NaCl-Quinip., $1,87 \pm 0,062$ Spines/ μm Dendrit) detektiert (* $p =$

0,0464, u. z.s. t-Test). Für alle weiteren untersuchten Hirnareale (A, B, D, E, F) konnte bezüglich der Gesamt-Spinezahl kein Unterschied zwischen den beiden Versuchstiergruppen nachgewiesen werden ($p > 0,05$, u. z.s. t-Test; s. Tab. 12). Die auf dem 3D-Algorithmus innerhalb der Definiens Architect XD-Software basierende automatische Differenzierung der verschiedenen morphologischen Spine-Klassen (Mushroom, Thin, Stubby, Filopodia) zeigte ebenfalls für die Kernregion des NAcc einen signifikanten Anstieg der Filopodia-Spines/ μm Dendrit (Abb. 35, C und Abb. 36, B) für die subchronisch mit Quinp. behandelten Ratten (Quinp.-Quinp., $0,25 \pm 0,021$ Spines/ μm Dendrit) im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren (NaCl-Quinp., $0,18 \pm 0,011$ Spines/ μm Dendrit; * $p = 0,0135$, u. z.s. t-Test). In Bezug auf den mPFC (Abb. 35 + 36, A) konnte nach subchronischer (Quinp.-Quinp., $0,48 \pm 0,032$ Spines/ μm Dendrit) verglichen mit akuter Quinp.-Applikation (NaCl-Quinp., $0,39 \pm 0,032$ Spines/ μm Dendrit) ein starker Trend für die Erhöhung der Thin-Spines festgestellt werden ((*) $p = 0,0525$, u. z.s. t-Test). Für das dorsale Striatum (Abb. 35, B), die Schalenregion des NAcc (D) sowie die apikalen (E) und basalen (F) Dendriten des CA1-Gebiets waren nach der subchronischen Injektion von Quinp. gegenüber den akut behandelten Kontrollen keine signifikanten Differenzen hinsichtlich der diversen Spine-Klassen feststellbar ($p > 0,05$, vgl. Tab. 12).

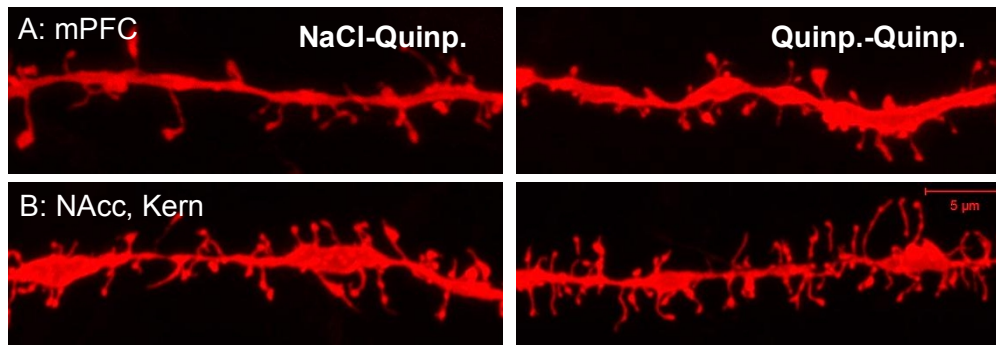
Tab. 12: Zusammenfassung der Mittelwerte \pm SEM, Stichprobengrößen sowie p-Werte der 3D-Spine-Analyse nach akuter bzw. subchronischer Quinpirol-Applikation

Hirnregion	Tiergruppe	Gesamt-Spines	Mushroom	Thin	Stubby	Filopodia
mPFC	NaCl-Quinp.	1,238 \pm 0,09857 n = 8	0,4641 \pm 0,04097 n = 8	0,3857 \pm 0,03216 n = 8	0,2762 \pm 0,02391 n = 8	0,09962 \pm 0,01705 n = 8
	Quinp.-Quinp.	1,457 \pm 0,06522 n = 8	0,5466 \pm 0,01678 n = 8	0,4821 \pm 0,03219 n = 8	0,2904 \pm 0,02585 n = 8	0,1077 \pm 0,009858 n = 7
p-Werte		0,0854	0,0838	0,0525	0,6925	0,7007
NAcc Schale	NaCl-Quinp.	1,695 \pm 0,04416 n = 8	0,6017 \pm 0,03214 n = 8	0,5505 \pm 0,02768 n = 8	0,3158 \pm 0,02036 n = 8	0,1902 \pm 0,005674 n = 8
	Quinp.-Quinp.	1,577 \pm 0,1092 n = 8	0,5715 \pm 0,04225 n = 8	0,4860 \pm 0,03474 n = 8	0,3104 \pm 0,03562 n = 8	0,1871 \pm 0,02600 n = 8
p-Werte		0,3360	0,5785	0,1681	0,8975	0,9092
NAcc Kern	NaCl-Quinp.	1,871 \pm 0,06159 n = 8	0,6924 \pm 0,03516 n = 8	0,6083 \pm 0,02596 n = 8	0,3372 \pm 0,02763 n = 8	0,1823 \pm 0,01093 n = 8
	Quinp.-Quinp.	2,070 \pm 0,06736 n = 8	0,7403 \pm 0,02212 n = 8	0,6573 \pm 0,02048 n = 8	0,4061 \pm 0,02652 n = 8	0,2481 \pm 0,02053 n = 8
p-Werte		0,0464	0,2677	0,1611	0,0935	0,0135
STR	NaCl-Quinp.	1,729 \pm 0,04526 n = 8	0,5996 \pm 0,02701 n = 8	0,5753 \pm 0,03639 n = 8	0,2527 \pm 0,01914 n = 8	0,2376 \pm 0,01729 n = 8
	Quinp.-Quinp.	1,804 \pm 0,09424 n = 8	0,6057 \pm 0,04926 n = 8	0,6169 \pm 0,03678 n = 8	0,2647 \pm 0,01692 n = 8	0,2408 \pm 0,007734 n = 8
p-Werte		0,4876	0,9157	0,4345	0,6441	0,8688
CA1 apikal	NaCl-Quinp.	1,914 \pm 0,05917 n = 8	0,5853 \pm 0,04379 n = 8	0,7703 \pm 0,01141 n = 7	0,4079 \pm 0,01565 n = 8	0,07056 \pm 0,01182 n = 8
	Quinp.-Quinp.	2,006 \pm 0,06485 n = 8	0,6661 \pm 0,02147 n = 8	0,8388 \pm 0,03452 n = 8	0,3629 \pm 0,02282 n = 8	0,07602 \pm 0,01006 n = 8
p-Werte		0,3122	0,1200	0,0989	0,1260	0,7303
CA1 basal	NaCl-Quinp.	1,771 \pm 0,07004 n = 8	0,5547 \pm 0,03075 n = 8	0,7348 \pm 0,01928 n = 8	0,3753 \pm 0,02289 n = 8	0,06368 \pm 0,007853 n = 8
	Quinp.-Quinp.	1,814 \pm 0,07528 n = 8	0,6052 \pm 0,03543 n = 8	0,7406 \pm 0,03564 n = 8	0,3567 \pm 0,01656 n = 8	0,06221 \pm 0,003791 n = 8
p-Werte		0,6837	0,3000	0,8875	0,5208	0,8687

Tabellarisch zusammengefasst sind die Mittelwerte \pm SEM der 3D-Spinezahlen insgesamt und je untersuchter Spine-Klasse im medial-präfrontalen Kortex (mPFC), dorsalen Striatum (STR), Nukleus accumbens (NAcc) sowie in CA1 (Cornu Ammonis, Areal 1) für akut (NaCl-Quinp.) bzw. subchronisch mit

0,25 mg/kg KGW Quinpirol applizierte Ratten (Quinp.-Quinp.). n: jeweilige Gruppengröße, p: Signifikanzniveau.

Abb. 36: Beispielhafte Exemplare Dil-markierter, distaler Dendritensegmente akut sowie subchronisch mit Quinpirol behandelter Sprague Dawley-Ratten



Zweidimensional abgebildet sind hier Beispiele Dil-markierter, distaler Dendritensegmente mit Spines von akut (NaCl-Quinp, linksseitige Fotos) sowie subchronisch (Quinp.-Quinp. rechtsseitige Fotos) mit 0,25 mg/kg Quinpirol behandelten Ratten des präfrontalen Kortex (A; mPFC) sowie der Kernregion des Nukleus accumbens (B; NAcc). Exemplarische Spine-Zahlen der ausgewerteten Original-3D-Bildstapel: A: 0,27 Thin-Spines/ μm (NaCl-Quinp.); 0,61 Thin-Spines/ μm (Quinp.-Quinp.). B: 1,46 Gesamt-Spines/ μm und 0,16 Filopodia-Spines/ μm (NaCl-Quinp.); 2,20 Gesamt-Spines/ μm und 0,51 Filopodia-Spines/ μm (Quinp.-Quinp.). Maßstab: 5 μm .

5.5.2 Neuroentwicklungsbiologische Modelle der Schizophrenie

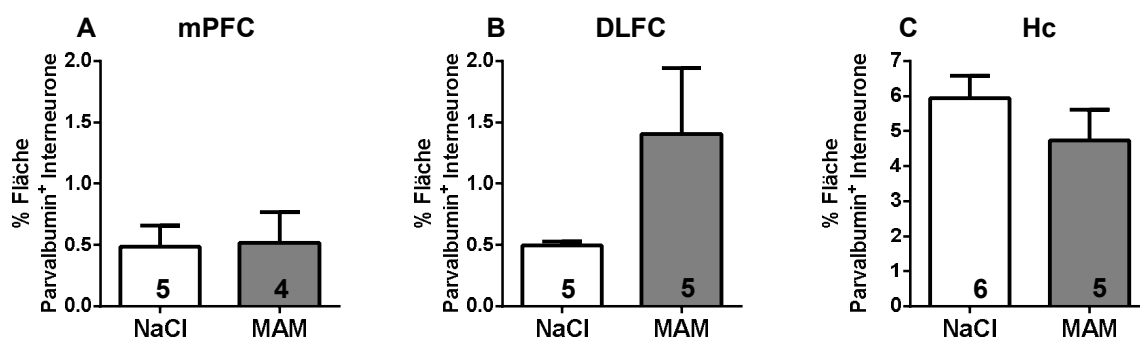
In der vorliegenden Dissertation wurden zwei verschiedene Rattenmodelle eingesetzt, um auf neuroentwicklungsbiologischem Wege Schizophrenie-typische Symptome tierexperimentell zu generieren. In beiden Fällen wurden die verwendeten Ratten pränatal, d. h. *in utero*, einer Substanz ausgesetzt, welche die neuronale Entwicklung beeinträchtigt. Zum einen handelte es sich dabei um das MAM-Modell, bei dem die Induktion einer schizophrenen Symptomatik auf einer pränatalen Applikation eines Neurotoxins und Kanzerogens (MAM) beruht. Zum anderen wurde das Poly I:C-Modell genutzt, um anhand einer pränatalen Behandlung mit einem Immunstimulans (Poly I:C) eine virale Infektion der Mutter während der Schwangerschaft als Umwelt-Risikofaktor für die Entwicklung von Schizophrenie in den Nachkommen zu simulieren. Die Auswirkungen der jeweiligen Substanz-Exposition *in utero* wurden im spät-adoleszenten (Poly I:C) bzw. adulten (MAM) Nachwuchs im Vergleich zu Vehikel-Kontrollen mittels histologischer und morphologischer Analysen eruiert.

5.5.2.1 Neurotoxische Induktion Schizophrenie-typischer Symptome mittels Methylazoxymethanolacetat-Exposition *in utero*

5.5.2.1.1 Quantifizierung kortikaler und hippocampaler PV⁺ Interneurone im MAM-Modell

Bezug nehmend auf die für Schizophrenie nachgewiesene Dysbalance zwischen den Neurotransmittern im Gehirn galt es, das neurotoxisch induzierte MAM-Modell der Schizophrenie auf entsprechende Netzwerkstörungen hin zu prüfen. Wie bei den zuvor erörterten pharmakologisch generierten Rattenmodellen lag der Fokus dabei auf der Detektion eines möglichen GABAergen Defizits. Zu diesem Zweck wurde erneut der Prozentanteil PV-positiver Interneurone an der jeweils analysierten Gesamtfläche des mPFC (A) und DLFC (B) sowie des Hippokampus (Hc; C) ermittelt (s. auch Abb. 10), wie aus den Diagrammen der Abbildung 37 hervorgeht. Die histologische Auswertung nach pränataler MAM-Exposition an GD 17 im Vergleich zu einer NaCl-Behandlung wurde in den Gehirnen des adulten (ca. 5 Monate) weiblichen Sprague Dawley-Rattennachwuchses vorgenommen. Für die Erfassung der PV⁺ Interneurone des mPFC wurden Cg1 sowie PrL ausgewertet; die Untersuchung des DLFC stützte sich auf die M1-Region. Bezüglich DLFC und Hc wurden pro Tier jeweils fünf konsekutive Schnitte (6 Serien) der linken Hirnhemisphäre für die histologische Auswertung herangezogen, hinsichtlich des mPFC waren es bis auf zwei Ausnahmen (2 bzw. 3 Schnitte) 4-5 Schnitte pro Tier.

Abb. 37: Quantifizierung der PV⁺ Interneurone in kortikalen und subkortikalen Hirnregionen nach NaCl- vs. MAM-Exposition *in utero*



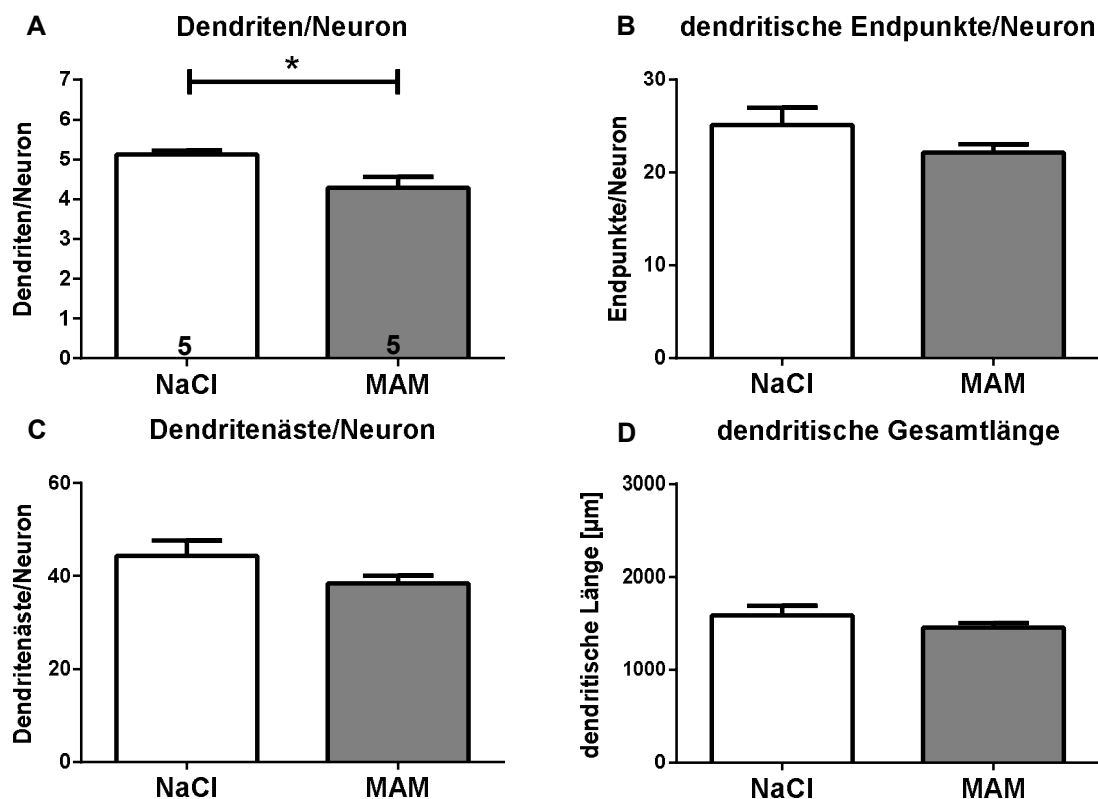
Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der prozentualen Anteile der PV⁺ Interneurone an der jeweils analysierten Gesamtfläche des medial-präfrontalen (A; mPFC) und dorsolateral-frontalen Kortex (B; DLFC) sowie des Hippokampus (C; Hc) für *in utero* (GD 17) mit 0,9 % NaCl (Kontrolltiere, NaCl) bzw. mit 25 mg/kg KGW MAM (Methylazoxymethanolacetat) behandelte Sprague Dawley-Ratten. Die Ziffern innerhalb der Säulen kennzeichnen die jeweilige Gruppengröße.

Weder für die beiden kortikalen (Abb. 37 A + B) noch für die hippocampale Region (C) gingen aus der quantitativen Bestimmung der PV⁺ Interneurone signifikante Differenzen zwischen den pränatal mit NaCl bzw. MAM behandelten Ratten hervor (u. z.s. t-Test, $p > 0,05$). Aus den Graphen ist allerdings ersichtlich, dass bei beiden Versuchstiergruppen im Hc der höchste (C; NaCl: 5,94 % \pm 0,64 %; MAM: 4,74 % \pm 0,87 %) und im mPFC der geringste Anteil (A; s. u.) PV⁺ Interneurone in Bezug auf die evaluierte Gesamtfläche vorlag, wobei sich für die Kontroll-Tiere in beiden Kortex-Gebieten (A + B) nahezu identische Mittelwerte ergaben (mPFC: 0,48 % \pm 0,17 %; DLFC: 0,49 % \pm 0,033 %). Für die MAM-Gruppe wurden hingegen im DLFC (B; 1,41 % \pm 0,53 %) fast dreimal so viele PV-immunreaktive Interneurone detektiert wie im mPFC (A; 0,52 % \pm 0,25 %).

5.5.2.1.2 Untersuchung der dendritischen Komplexität hippocampaler Pyramidenneurone im MAM-Modell

Auf Basis der Sholl-Analyse war es möglich, die Komplexität der neuronalen Dendriten hippocampaler Pyramidenzellen in CA1, CA2 und CA3 zu evaluieren. Die Grundlage dafür bildeten dreidimensional rekonstruierte Neurone der drei Subregionen des Hippokampus (vgl. Abb. 38b, 39b, 40b), für welche sowohl die Anzahlen der Dendriten (Abb. 38a, 39a, 40a, A), der dendritischen Endpunkte (Abb. 38a, 39a, 40a, B) sowie der Dendritenäste (Abb. 38a, 39a, 40a, C) je Pyramidenneuron als auch die Gesamtlänge aller Dendriten [μ m] pro Nervenzelle (Abb. 38a, 39a, 40a, D) automatisiert erfasst wurden. Die Auswertung erfolgte in koronaren Hirnschnitten der rechten Hemisphäre des adulten Nachwuchses nach pränataler MAM- gegenüber NaCl-Applikation. In Hinblick auf die CA1-Region wurden durchschnittlich 3-5 Pyramidenzellen je Tier untersucht, während in CA2 2-4 und in CA3 1-2 geeignete Neurone pro Tier für die Sholl-Analyse herangezogen werden konnten.

Abb. 38a: Graphische Darstellung der mittels Sholl-Analyse erfassten dendritischen Komplexität der Pyramidenneurone in CA1 nach NaCl- vs. MAM-Exposition *in utero*

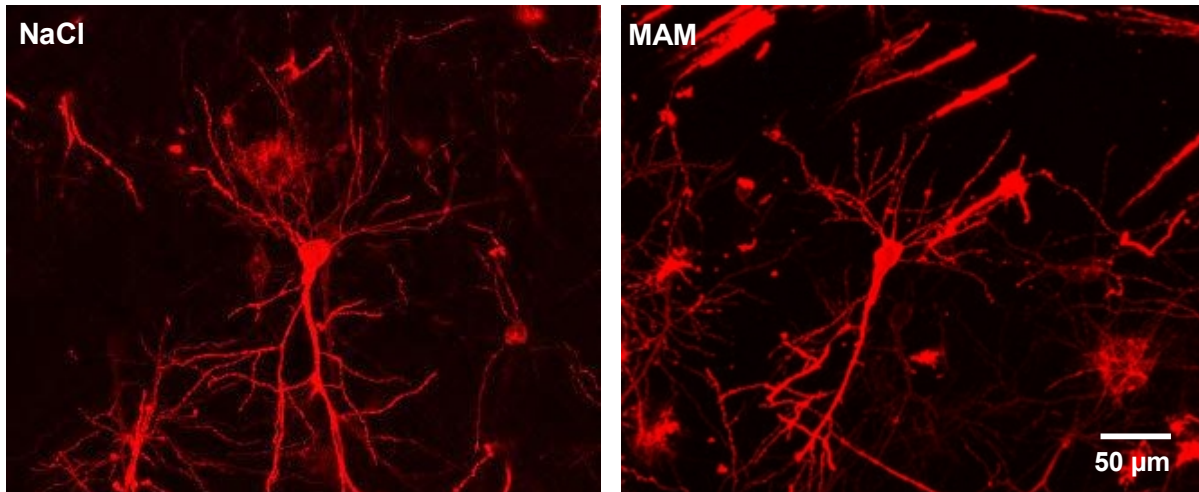


Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der vier evaluierten Komplexitätsparameter der CA1-Pyramidenneurone (Cornu Ammonis, Areal 1) für *in utero* (GD 17) mit 0,9 % NaCl (Kontrolltiere, NaCl) bzw. mit 25 mg/kg KGW MAM behandelte Sprague Dawley-Ratten. *: signifikant, $p = 0,0196$. Die Ziffern innerhalb der Säulen kennzeichnen die jeweilige Gruppengröße, die für alle evaluierten Parameter der hippocampalen CA1-Region Gültigkeit besitzt.

Wie im ersten Balkendiagramm in Abb. 38a (A) veranschaulicht, zeigten die MAM-Tiere ($4,28 \pm 0,28$) verglichen mit den NaCl-Kontrollen ($5,13 \pm 0,082$) signifikant weniger Dendriten/Pyramidenzelle (u. z.s. t-Test, * $p = 0,0196$). Hinsichtlich der Endpunkte und Dendritenäste/Neuron sowie der Dendritenlänge konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Tiergruppen nachgewiesen werden ($p > 0,05$). Dennoch ist anhand der Graphiken erkennbar, dass die Anzahl der Dendritenenden (B; NaCl: $25,12 \pm 1,81$, MAM: $22,17 \pm 0,90$) wie auch die der Dendritenäste (C; NaCl: $44,38 \pm 3,36$, MAM: $38,43 \pm 1,62$) je Neuron nach MAM- verglichen mit NaCl-Behandlung minimal verringert ist (n. s.). Entsprechendes konnte auch für die dendritische Länge ([µm], D; NaCl: $1588 \pm 101,7$ µm, MAM: $1451 \pm 50,81$ µm) festgestellt werden (n. s.). Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die Dendriten der Pyramidenzellen der CA1-Region in den von mit MAM

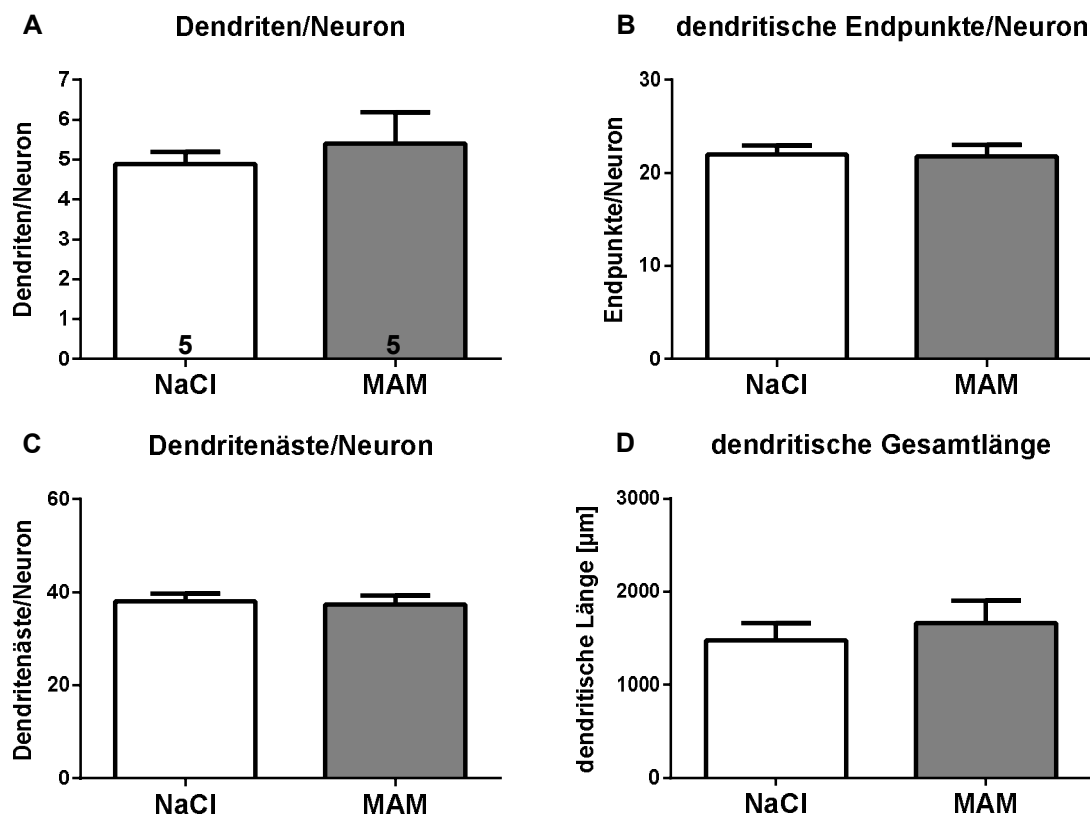
behandelten Müttern abstammenden Nachkommen insgesamt eine leicht reduzierte dendritische Komplexität besaßen als die der adäquaten Kontrolltiere (vgl. Abb. 38b).

Abb. 38b: Beispielhafte Exemplare Dil-markierter Pyramidenneurone in CA1 nach NaCl- vs. MAM-Exposition *in utero*



Zweidimensional zu sehen sind hier Beispiele Dil-markierter Pyramidenneurone in CA1 (Cornu Ammonis, Areal 1) von *in utero* (GD 17) mit 0,9 % NaCl (linksseitiges Foto) bzw. mit 25 mg/kg KGW MAM (rechtsseitiges Foto) behandelten Sprague Dawley-Ratten, die für die Sholl-Analyse dreidimensional rekonstruiert wurden. Exemplarische Dendriten-Zahlen der ausgewerteten Original-3D-Bildstapel: NaCl: 6 Dendriten/Neuron; MAM: 5 Dendriten/Neuron. Maßstab: 50 µm.

Abb. 39a: Graphische Darstellung der mittels Sholl-Analyse erfassten dendritischen Komplexität der Pyramidenneurone in CA2 nach NaCl- vs. MAM-Exposition *in utero*

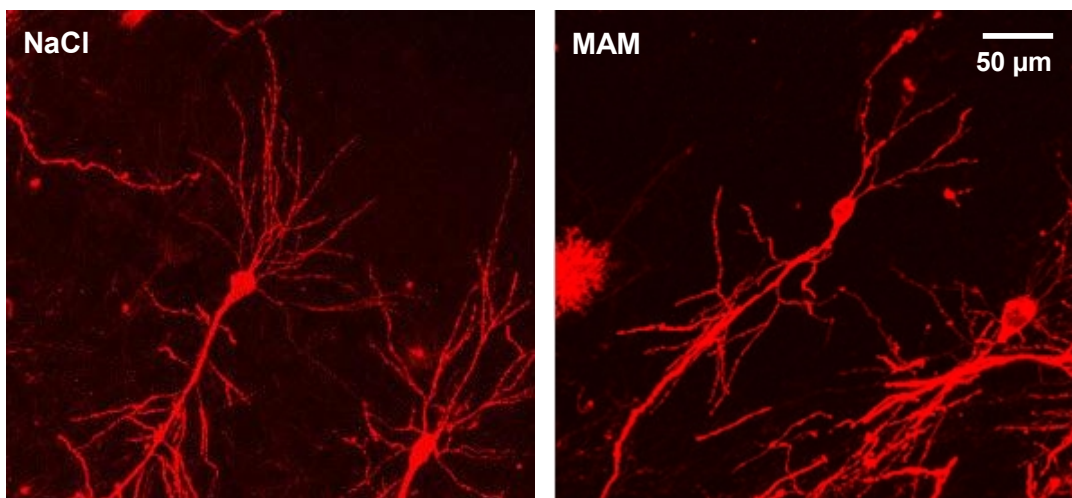


Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der vier evaluierten Komplexitätsparameter der CA2-Pyramidenneurone (Cornu Ammonis, Areal 2) für *in utero* (GD 17) mit 0,9 % NaCl (Kontrolltiere, NaCl) bzw. mit 25 mg/kg KGW MAM behandelte Sprague Dawley-Ratten. Die Ziffern innerhalb der Säulen kennzeichnen die jeweilige Gruppengröße, die für alle evaluierten Parameter der hippocampalen CA2-Region Gültigkeit besitzt.

In Bezug auf die in der CA2-Region des Hippokampus lokalisierten Pyramidenzellen konnten anhand der Sholl-Analyse keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den MAM- und NaCl-behandelten Ratten in der Anzahl der Dendriten, der dendritischen Endpunkte, der Dendritenäste sowie der dendritischen Gesamtlänge [µm] pro Nervenzelle detektiert werden (u. z.s. t-Test, $p > 0,05$; s. Abb. 39a, A-D). Aus dem Vergleich der Mittelwerte beider Versuchstiergruppen geht jedoch hervor, dass die MAM-Tiere geringfügig mehr Dendriten/Neuron ($5,40 \pm 0,78$) aufwiesen als deren Kontrollen ($4,88 \pm 0,30$; Abb. 39a, A; n. s.). Ferner zeigten die Nachkommen der mit dem Neurotoxin applizierten Mütter eine minimal erhöhte dendritische Gesamtlänge ($1665 \pm 235,9$ µm) als der von NaCl-behandelten Weibchen ausgetragene Nachwuchs ($1480 \pm 187,5$ µm; D; n. s.). Sowohl die Anzahl der Dendritenenden (B; NaCl: $22,02 \pm 0,90$, MAM: $21,80 \pm 1,19$) als auch die der

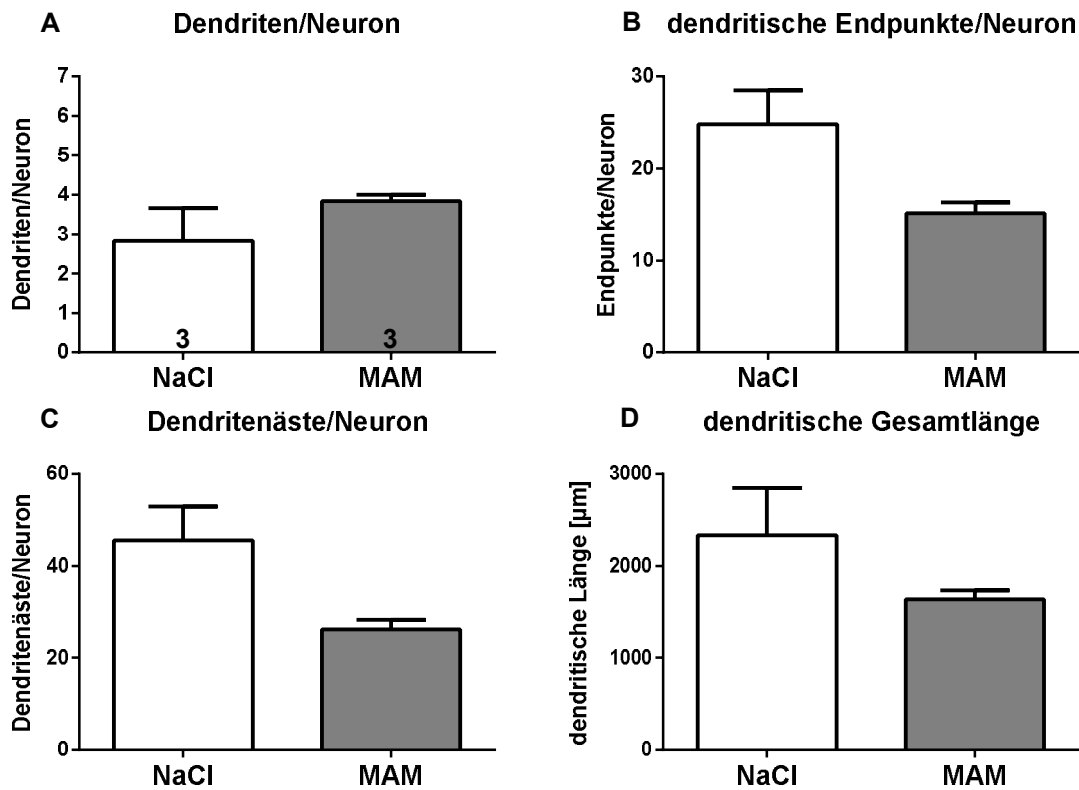
Dendritenäste (C; NaCl: $38,10 \pm 1,60$, MAM: $37,43 \pm 1,95$) betreffend resultierten aus der statistischen Analyse für beide Nagergruppen nahezu identische Werte. Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse kann für die Pyramidenzellen der CA2-Region eine mehr oder weniger unveränderte Komplexität der Dendriten im MAM-Modell verglichen mit NaCl-Kontrollen angenommen werden (s. Abb. 39b).

Abb. 39b: Beispielhafte Exemplare Dil-markierter Pyramidenneurone in CA2 nach NaCl- vs. MAM-Exposition *in utero*



Zweidimensional gezeigt sind hier Beispiele Dil-markierter Pyramidenneurone in CA2 (Cornu Ammonis, Areal 2) von *in utero* (GD 17) mit 0,9 % NaCl (linksseitiges Foto) bzw. mit 25 mg/kg KGW MAM (rechtsseitiges Foto) behandelten Sprague Dawley-Ratten, die für die Sholl-Analyse dreidimensional rekonstruiert wurden. Maßstab: 50 µm.

Abb. 40a: Graphische Darstellung der mittels Sholl-Analyse erfassten dendritischen Komplexität der Pyramidenneurone in CA3 nach NaCl- vs. MAM-Exposition *in utero*

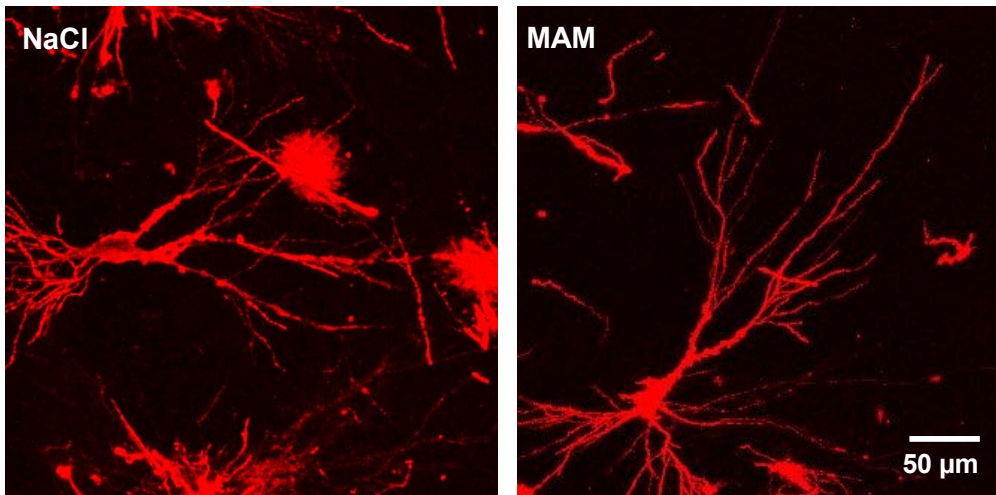


Graphisch veranschaulicht sind die Mittelwerte \pm SEM der vier evaluierten Komplexitätsparameter der CA3-Pyramidenneurone (Cornu Ammonis, Areal 3) für *in utero* (GD 17) mit 0,9 % NaCl (Kontrolltiere, NaCl) bzw. mit 25 mg/kg KGW MAM behandelte Sprague Dawley-Ratten. Die Ziffern innerhalb der Säulen kennzeichnen die jeweilige Gruppengröße, die für alle evaluierten Parameter der hippocampalen CA3-Region Gültigkeit besitzt.

Wie für die CA2-Region (s. o.) ergab die Sholl-Analyse der Pyramidenzellfortsätze des hippocampalen CA3-Gebiets keine statistisch signifikanten Differenzen zwischen den Nachkommen der mit NaCl- bzw. MAM-applizierten Ratten (u. z.s. t-Test, $p > 0,05$; s. Abb. 40a, A-D). Dennoch fällt bei Betrachtung der Mittelwerte auf, dass die MAM-Tiere bezüglich der Dendriten/Pyramidenzelle (Abb. 40a, A) eine leicht erhöhte Gesamtzahl ($3,83 \pm 0,17$) gegenüber den NaCl-Tieren ($2,83 \pm 0,83$) aufwiesen (n. s.). Im Gegensatz dazu waren die dendritische Länge (D; NaCl: $2332 \pm 516,2 \mu\text{m}$, MAM: $1636 \pm 101,1 \mu\text{m}$) sowie die Anzahlen der dendritischen Endpunkte (B) und Äste (C) in den Ratten der MAM-Gruppe verglichen mit ihren Kontrollen erkennbar verringert (n. s.). Sowohl in Hinblick auf die dendritischen Endigungen (B; NaCl: $24,83 \pm 3,66$, MAM: $15,17 \pm 1,17$, $p = 0,0654$) als auch hinsichtlich der Dendritenäste (C; NaCl: $45,50 \pm 7,37$, MAM, $26,17 \pm 2,17$,

$p = 0,0655$) lag ein statistischer Trend vor. Daraus lässt sich folgern, dass die pränatale MAM-Behandlung zu einer kürzeren, zum anderen weniger verzweigten Dendriten in den Nachkommen hervorrief. Demnach zeigte sich für das MAM-Modell tendenziell eine reduzierte dendritische Komplexität für die in CA3 positionierten Pyramidenzellen.

Abb. 40b: Beispielhafte Exemplare Dil-markierter Pyramidenneurone in CA3 nach NaCl- vs. MAM-Exposition *in utero*

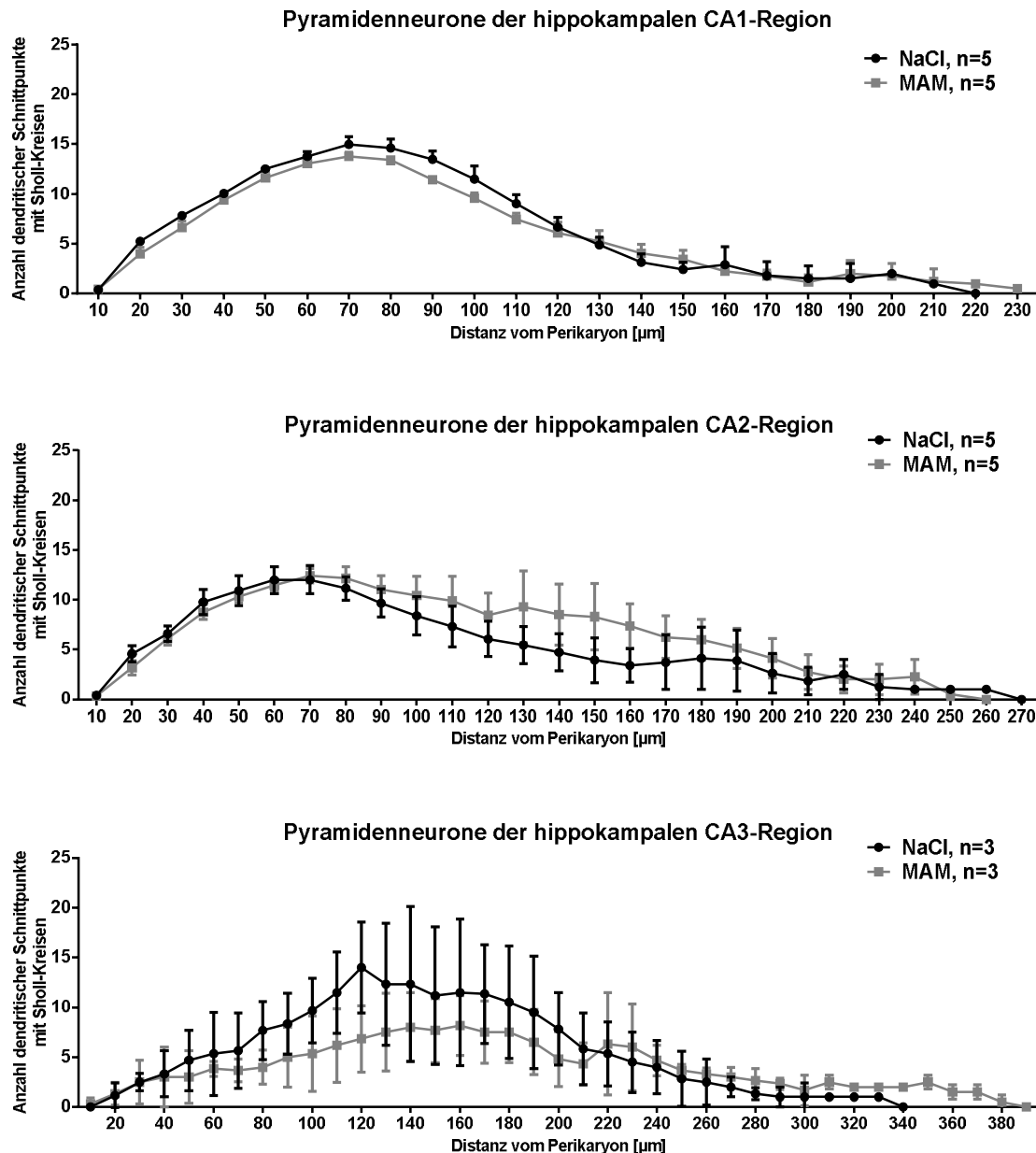


Zweidimensional gezeigt sind hier Beispiele Dil-markierter Pyramidenneurone in CA3 (Cornu Ammonis, Areal 3) von *in utero* (GD 17) mit 0,9 % NaCl (linksseitiges Foto) bzw. mit 25 mg/kg KGW MAM (rechtsseitiges Foto) behandelten Sprague Dawley-Ratten, die für die Sholl-Analyse dreidimensional rekonstruiert wurden. Exemplarische Daten der ausgewerteten Original-3D-Bildstapel: NaCl: 26 dendritische Endpunkte/Neuron, 45 Dendritenäste/Neuron; MAM: 25 dendritische Endpunkte/Neuron, 45 Dendritenäste/Neuron. Maßstab: 50 µm.

Die voranstehend erläuterten Erkenntnisse stimmen mit den aus den Kurvendigrammen der Abbildung 41 (s. u.) hervorgehenden Aussagen überein. Wie auch aus den folgenden Graphiken ersichtlich ist, wiesen die NaCl-behandelten Tiere bezüglich der in CA1 (NaCl: 7,44, MAM: 6,48) und CA3 (NaCl: 6,17, MAM: 4,21) angesiedelten Pyramidenneurone durchschnittlich eine geringfügig höhere (n. s.) Anzahl dendritischer Schnittpunkte mit den konzentrisch um das Perikaryon verlaufenden Sholl-Kreisen auf als die MAM-exponierten Ratten. Aus diesem Grund waren auch nicht signifikant erhöhte Anzahlen an dendritischen Endpunkten und Dendritenästen dieser Zellen nachweisbar (s. o.). Für die CA2-Pyramidenneurone war hingegen das Gegenteil feststellbar (Kreis-Schnittpunkte NaCl: 6,10, MAM: 7,20). Obwohl die Pyramidenzellen beider Versuchsgruppen in CA3 deutlich längere (NaCl: 340 µm, MAM: 390 µm) Fortsätze besaßen als in CA1 (NaCl: 220 µm, MAM: 230 µm) und CA2 (NaCl: 270 µm, MAM: 260 µm), zeigten diese im Fall der MAM-

Tiere die geringste dendritische Komplexität, was sich anhand der im Durchschnitt geringsten Anzahl an Kreis-Schnittpunkten bestätigen lässt. Bezüglich der NaCl-Ratten war die Anzahl der Kreis-Schnittpunkte für CA2- und CA3-Zellen fast identisch und demnach für die Pyramidenneurone der CA1-Region am höchsten. Letzteres war für die MAM-behandelten Tiere in CA2 feststellbar, was darauf beruhte, dass die CA2-Neurone in einer Distanz zwischen ca. 80 μm und 210 μm vom Soma eine leicht erhöhte Schnittpunktzahl ihrer Dendriten mit den virtuellen Kreisen im Vergleich zu den Pyramidenzellen der Kontrollen zeigten. Die untersuchten Nervenzellen der NaCl-Tiere besaßen hingegen in CA1-3 sowohl in unmittelbarer Nähe des Zellkörpers als auch in den letzten etwa 30 μm ihrer Dendriten die geringste dendritische Komplexität. Hinsichtlich der CA1- und CA3-Pyramidenneurone war dies auch für die MAM-Gruppe gültig. Generell verdeutlichen die Kurvenverläufe beider Tiergruppen, dass in allen drei Subregionen des Ammonshorns gegen Ende des ersten Drittels der Entfernung vom Soma die höchste Anzahl an Kreis-Schnittpunkten und somit die höchste Komplexität der Dendriten detektiert wurde, welche außer in CA3 für beide Gruppen nahezu identisch war.

Abb. 41: Anzahl der Schnittpunkte zwischen den Dendriten der Pyramidenneurone in CA1-3 und den konzentrischen Sholl-Kreisen nach NaCl- vs. MAM-Exposition *in utero*



Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der dendritischen Schnittpunkte hippocampaler Pyramidenneurone mit den virtuellen, konzentrisch um das Soma verlaufenden Sholl-Kreisen in Abhängigkeit von der Distanz zum Soma [μm] für *in utero* (GD 17) mit 0,9 % NaCl (Kontrolltiere, NaCl) bzw. mit 25 mg/kg KGW MAM behandelte Sprague Dawley-Ratten.

Aus der Gegenüberstellung der Resultate für CA1, CA2 und CA3 ist ersichtlich, dass die Kontrolltiere in der CA1-Region des Hippokampus die meisten und verglichen mit den Ratten der MAM-Gruppe signifikant mehr Dendriten pro Pyramidenzelle besaßen. Für die MAM-Tiere wurde hingegen in CA2 die höchste Anzahl an Dendriten/Neuron detektiert. Im

hippokampalen CA3-Areal zeigten beide Versuchsgruppen am wenigsten Dendriten je Nervenzelle. Die meisten dendritischen Endigungen wurden für die Ratten beider Behandlungen in CA1 festgestellt. Dagegen wiesen die Pyramidenzellen in CA2 (NaCl) bzw. CA3 (MAM) die wenigsten Endpunkte auf. Während die in CA3 lokalisierten Nervenzellen der NaCl-Tiere am stärksten und die in CA2 am wenigsten verzweigt waren, wurden die analogen Ergebnisse für die MAM-Ratten in CA1 und CA3 ermittelt. Hinsichtlich der dendritischen Gesamtlänge wurde für die NaCl-Tiere in CA3 der größte und in CA2 der kleinste Wert ermittelt; demgegenüber war die Dendritenlänge der MAM-Ratten in diesen Bereichen nahezu identisch.

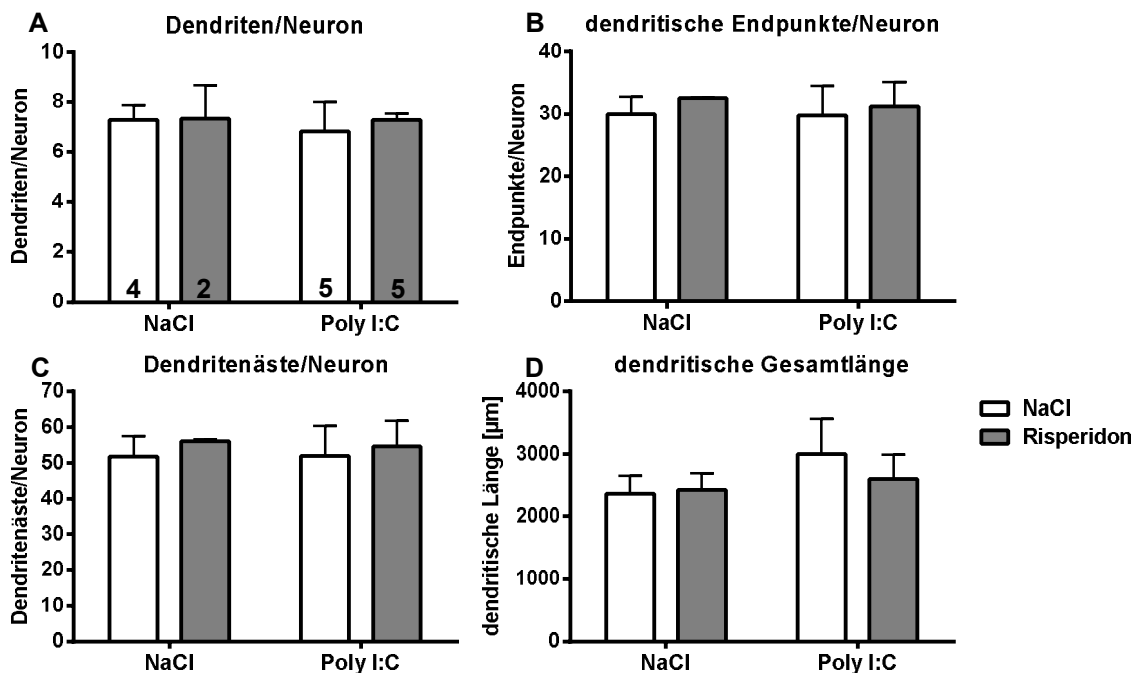
5.5.2.2 Immunologische Induktion Schizophrenie-typischer Symptome mittels pränataler Poly I:C-Exposition

5.5.2.2.1 Untersuchung der dendritischen Komplexität kortikaler sowie hippocampaler Pyramidenneurone nach pränataler Poly I:C- und postnataler Risperidon-Behandlung

Um eine maternale Virusinfektion während der Schwangerschaft als Umwelt-Risikofaktor für die Entstehung von Schizophrenie in den Nachkommen tierexperimentell nachzuahmen, wurde trächtigen Wistar-Rattenweibchen an GD 15 einmalig die synthetische Doppelstrang-RNA Poly I:C oder NaCl als Vehikel i.v. verabreicht (s. dazu auch Abb. 8, Experimentelles Design). Als therapeutische bzw. kompensatorische Maßnahme wurden die männlichen Nachkommen während der Adoleszenz (PND 34 - 47) subchronisch mit dem atypischen Antipsychotikum Risperidon oder wiederum mit NaCl behandelt (vgl. Abb. 8). In den Gehirnen der daraus resultierenden vier differenten Versuchstiergruppen NaCl-NaCl, NaCl-RIS, Poly I:C-NaCl, Poly I:C-RIS wurde zum Zeitpunkt der späten Adoleszenz (PND 48) zunächst die Ausprägung der dendritischen Komplexität kortikaler (mPFC) wie auch hippocampaler (CA1) Pyramidenneurone beurteilt. Demnach kam auch hier die Sholl-Analyse auf der Basis dreidimensional rekonstruierter Neurone, exemplarisch unten in Abbildung 42b dargestellt, zum Einsatz. Die Resultate folgender Sholl-Parameter sind in Abbildung 42a graphisch aufgeführt: Anzahl der Dendriten/Neuron (A), Quantität der dendritischen Endigungen/Neuron (B), Summe der dendritischen Verzweigungen bzw. Dendritenäste/Neuron (C) wie auch die Gesamtlänge [μm] aller Dendriten/Neuron (D). Sowohl den mPFC als auch die CA1-Region betreffend wurden mehrheitlich zwei bis drei (selten mehr) Pyramidenzellen je Versuchstier auf ihre

Komplexität hin untersucht. Alternierend wurden Koronarschnitte der rechten bzw. linken Hirnhemisphäre für die Sholl-Analyse herangezogen.

Abb. 42a: Graphische Darstellung der mittels Sholl-Analyse erfassten dendritischen Komplexität der Pyramidenneurone des mPFC nach pränataler Poly I:C- und postnataler Risperidon-Behandlung



Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der vier evaluierten Komplexitätsparameter der Pyramidenneurone im medial-präfrontalen Kortex (mPFC) für pränatal (GD 15) mit 0,9 % NaCl (Kontrolltiere, NaCl) bzw. 4 mg/kg KGW Poly I:C (Polyinosin-Polycytidylsäure) behandelte Wistar-Ratten. Den Tieren beider Gruppen wurde zusätzlich postnatal (PND 34-47) entweder 0,9 % NaCl als Vehikel (weiße Säulenfarbe) oder 0,045 mg/kg KGW Risperidon (Antipsychotikum) (graue Säulenfarbe) verabreicht, woraus vier verschiedene Behandlungsgruppen resultierten. Die Ziffern innerhalb der Säulen kennzeichnen die jeweilige Gruppengröße, die für alle evaluierten Parameter des mPFC Gültigkeit besitzt.

Aus allen vier Graphen obiger Abbildung 42a ist eindeutig erkennbar, dass für keinen der mittels Sholl-Analyse evaluierten Parameter signifikante Unterschiede zwischen den vier Tiergruppen festgestellt wurden (Two-way ANOVA, Bonferroni Post-hoc Tests, $p > 0,05$). Vielmehr wurden trotz unterschiedlicher Behandlungen sehr homogene Durchschnittswerte für alle Versuchsgruppen ermittelt, die unten in Tabelle 13 zusammengefasst sind. Somit kann aus der Sholl-Analyse geschlossen werden, dass weder die pränatale Poly I:C-Exposition an GD 15 noch die postnatale RIS-Gabe an den Tagen 34-47 einen Einfluss auf die dendritische Komplexität der Pyramidenneurone des mPFC hatte, welche beispielhaft in Abbildung 42b zu sehen sind. An dieser Stelle muss

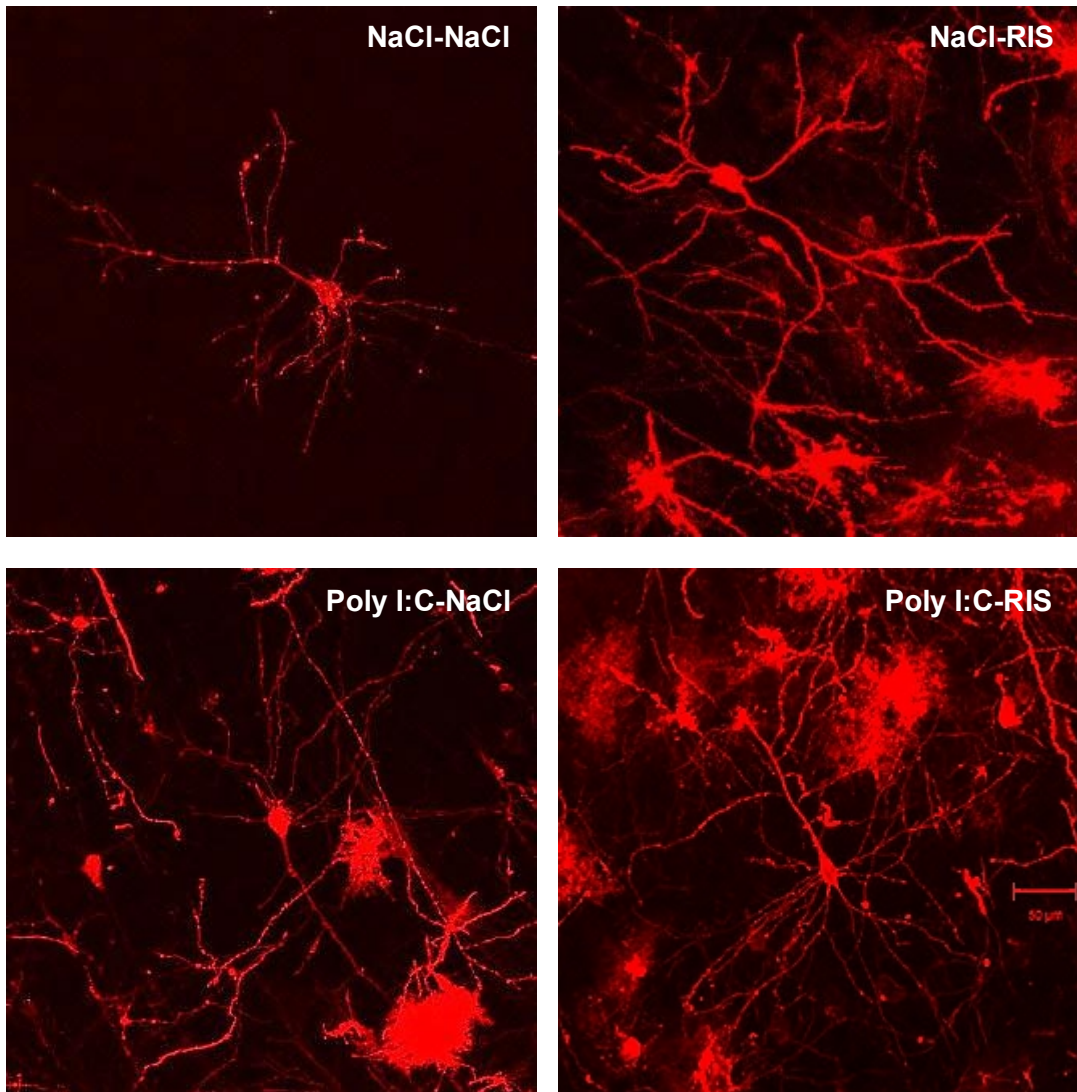
darauf verwiesen werden, dass die Aussagekraft der Erkenntnisse bezüglich der NaCl-RIS-Gruppe wegen der besonders geringen Tierzahl ($n = 2$) eingeschränkt ist. Aufgrund der nahezu identischen Komplexität der Dendriten im mPFC - unabhängig von prä- und postnataler Behandlung - ist jedoch nicht davon auszugehen, dass ein Stichprobenumfang von z. B. fünf Ratten wesentlich andere Ergebnisse geliefert hätte.

Tab. 13: Übersicht der mittels Sholl-Analyse gewonnenen Daten für die Pyramidenneurone des medial-präfrontalen Kortex

Tiergruppe	Gruppengröße	Dendriten/ Neuron	Endpunkte/ Neuron	Dendritenäste/ Neuron	Dendritische Länge [μm]
NaCl-NaCl	4	$7,29 \pm 0,58$	$30,0 \pm 2,78$	$51,77 \pm 5,71$	$2365 \pm 291,1$
NaCl-RIS	2	$7,33 \pm 1,33$	$32,50 \pm 0,17$	$56,0 \pm 0,67$	$2427 \pm 267,0$
Poly I:C-NaCl	5	$6,83 \pm 1,17$	$29,73 \pm 4,74$	$51,93 \pm 8,44$	$3003 \pm 567,0$
Poly I:C-RIS	5	$7,30 \pm 0,26$	$31,20 \pm 3,84$	$54,55 \pm 7,21$	$2597 \pm 393,2$

Angegeben sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM der vier evaluierten Parameter der Sholl-Analyse im medial-präfrontalen Kortex für die vier Versuchsgruppen. NaCl-NaCl: Kontrollgruppe, prä- und postnatal 0,9 % NaCl; NaCl-RIS: pränatal 0,9 % NaCl, postnatal 0,045 mg/kg KGW RIS (Risperidon); Poly I:C-NaCl: pränatal 4 mg/kg KGW Poly I:C, postnatal 0,9 % NaCl; Poly I:C-RIS: pränatal 4 mg/kg KGW Poly I:C, postnatal 0,045 mg/kg KGW RIS.

Abb. 42b: Beispielhafte Exemplare Dil-markierter Pyramidenneurone im mPFC nach pränataler Poly I:C- und postnataler Risperidon-Behandlung

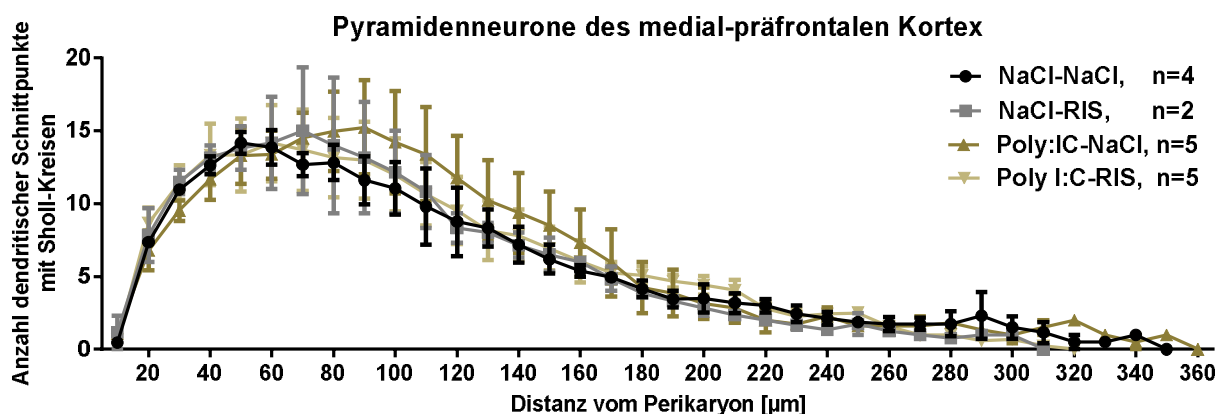


Zweidimensional abgebildet sind hier Beispiele Dil-markierter Pyramidenneurone im medial-präfrontalen Kortex (mPFC) von prä- (GD 15) und postnatal (PND 34-47) mit 0,9 % NaCl (NaCl-NaCl), pränatal mit 0,9 % NaCl und postnatal mit 0,045 mg/kg KGW RIS (Risperidon) (NaCl-RIS), pränatal mit 4 mg/kg KGW Poly I:C und postnatal mit 0,9 % NaCl (Poly I:C-NaCl) sowie pränatal mit 4 mg/kg KGW Poly I:C und postnatal mit 0,045 mg/kg KGW RIS (Poly I:C-RIS) behandelten Wistar-Ratten, die für die Sholl-Analyse dreidimensional rekonstruiert wurden. Maßstab: 50 µm.

Die oben beschriebene Homogenität der Resultate der Sholl-Analyse geht auch aus dem folgenden Kurvendiagramm (Abb. 43) hervor. Die kortikalen Pyramidenneurone aller vier Versuchstiergruppen zeigten bei einer Distanz zwischen 50 µm und 90 µm zum Zellkörper, d. h. in der ersten Hälfte der Länge ihrer Dendriten, die höchste Anzahl an dendritischen Schnittpunkten mit den konzentrisch um das Soma verlaufenden virtuellen Sholl-Kreisen und somit ihre höchste dendritische Komplexität. Im Durchschnitt wichen die Anzahlen der

Kreis-Schnittpunkte aller Tiergruppen kaum voneinander ab (NaCl-NaCl: 3,35, NaCl-RIS: 2,98, Poly I:C-NaCl: 3,89, Poly I:C-RIS: 3,75). Auch der längste Fortsatz der Pyramidenneurone war bezüglich der NaCl-NaCl- (350 μm) sowie der Poly-NaCl-Gruppe (360 μm) nahezu identisch, wodurch ein Poly-IC-Effekt auf die Länge der Dendriten ausgeschlossen werden konnte. In Hinblick auf die beiden postnatal mit RIS behandelten Versuchsgruppen fiel auf, dass der längste Pyramidenzell-Dendrit hier etwas kürzer war (NaCl-RIS: 310 μm , Poly I:C-RIS: 320 μm) als bei den mit NaCl applizierten Ratten und wiederum kein Poly I:C-Effekt nachweisbar war. Jedoch schien die Gabe des Antipsychotikums Risperidon eine geringfügige Reduktion der dendritischen Länge zu bewirken. Um jedoch diesbezüglich eine finale Aussage treffen zu können, ist aufgrund der geringen Stichprobenumfänge, insbesondere der NaCl-RIS-Gruppe ($n = 2$), eine Wiederholung der Untersuchung mit möglichst größeren Tierzahlen je Gruppe erforderlich.

Abb. 43: Anzahl der Schnittpunkte zwischen den Dendriten der Pyramidenneurone im mPFC und den konzentrischen Sholl-Kreisen nach pränataler Poly I:C- und postnataler Risperidon-Behandlung



Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der dendritischen Schnittpunkte kortikaler Pyramidenneurone des medial-präfrontalen Kortex mit den virtuellen, konzentrisch um das Soma verlaufenden Sholl-Kreisen in Abhängigkeit von der Distanz zum Soma [μm] für prä- (GD 15) und postnatal (PND 34-47) mit 0,9 % NaCl (NaCl-NaCl), pränatal mit 0,9 % NaCl und postnatal mit 0,045 mg/kg KGW RIS (Risperidon) (NaCl-RIS), pränatal mit 4 mg/kg KGW Poly I:C und postnatal mit 0,9 % NaCl (Poly I:C-NaCl) sowie pränatal mit 4 mg/kg KGW Poly I:C und postnatal mit 0,045 mg/kg KGW RIS (Poly I:C-RIS) behandelte Wistar-Ratten.

Neben der Untersuchung des mPFC wurde die Sholl-Analyse zur Beurteilung der dendritischen Komplexität auch für die in der hippocampalen CA1-Region lokalisierten Pyramidenneurone durchgeführt. Aus der Entblindung der Tierzahlen nach Abschluss der Auswertung resultierte jedoch für die NaCl-behandelte Kontrollgruppe (NaCl-NaCl) eine Tierzahl von $n = 1$. Aufgrund dieser unzureichenden Gruppengröße musste auf eine

statistische Darstellung der gewonnenen Daten verzichtet werden. Zur Übersicht sind die Mittelwerte der betrachteten Parameter für die übrigen Behandlungsgruppen jedoch in Tabelle 14 zusammengefasst. Um fundierte Schlüsse aus der Sholl-Analyse des CA1-Gebiets ziehen zu können, sind weitere Evaluationen auf der Grundlage größerer Stichprobenumfänge erforderlich. Trotz des Fehlens der Kontrolltiere soll an diesem Punkt erwähnt werden, dass den derzeitigen Resultaten für die CA1-Pyramidenzellen keinerlei signifikante Unterschiede bezüglich der dendritischen Komplexität nach pränataler Poly I:C-Exposition an GD 15 und/oder postnataler RIS-Behandlung an den Tagen 34-47 zu entnehmen sind. Stattdessen deuten die Daten (vgl. Tab. 14), ähnlich wie bereits oben für den mPFC beschrieben, auf eine starke Homogenität zwischen den vier verschiedenen Behandlungsgruppen hin.

Tab. 14: Übersicht der mittels Sholl-Analyse gewonnenen Daten für die Pyramidenneurone der hippocampalen CA1-Region

Tiergruppe	Gruppengröße	Dendriten/ Neuron	Endpunkte/ Neuron	Dendritenäste/ Neuron	Dendritische Länge [µm]
NaCl-NaCl	1	4,0	41,33	76,67	3626
NaCl-RIS	3	4,94 ± 0,75	50,72 ± 3,62	94,94 ± 6,28	3966 ± 150,5
Poly I:C-NaCl	4	5,63 ± 0,43	46,42 ± 2,73	85,63 ± 5,8	3616 ± 174,4
Poly I:C-RIS	2	5,60 ± 1,4	47,85 ± 2,65	88,40 ± 3,6	3458 ± 141,0

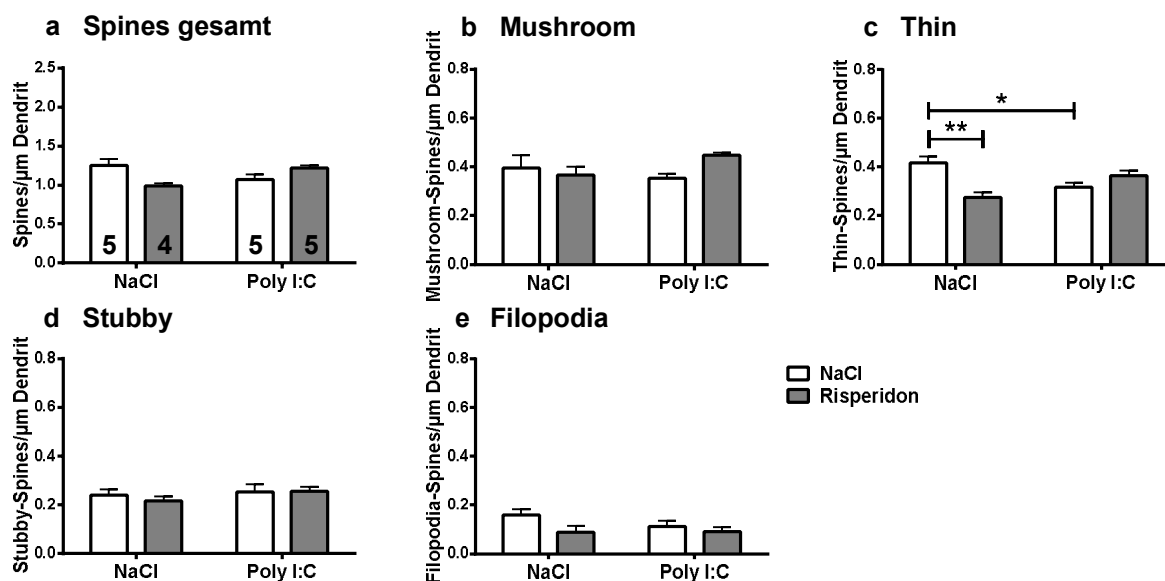
Tabellarisch zusammengefasst sind hier die Mittelwerte ± SEM der vier evaluierten Parameter der Sholl-Analyse der hippocampalen CA1-Region (Cornu Ammonis, Areal 1) für die vier Versuchsgruppen. NaCl-NaCl: Kontrollgruppe, prä- und postnatal 0,9 % NaCl; NaCl-RIS: pränatal 0,9 % NaCl, postnatal 0,045 mg/kg KGW RIS (Risperidon); Poly I:C-NaCl: pränatal 4 mg/kg KGW Poly I:C, postnatal 0,9 % NaCl; Poly I:C-RIS: pränatal 4 mg/kg KGW Poly I:C, postnatal 0,045 mg/kg KGW RIS. Eine Ausnahme stellt hierbei die NaCl-NaCl-Gruppe dar, für welche lediglich ein Wert ermittelt wurde.

5.5.2.2 Untersuchung synaptischer Dornfortsätze nach pränataler Poly I:C- und postnataler Risperidon-Behandlung

Um denkbare, aus der Aktivierung des maternalen Immunsystems während der Trächtigkeit resultierende Beeinträchtigungen in Quantität und Morphologie der synaptischen Dornfortsätze zu erforschen, wurde auch für dieses Rattenmodell der Schizophrenie die automatische 3D-Spine-Analyse mit Hilfe des etablierten Definiens-3D-

Algorithmus durchgeführt. Neben den Effekten der pränatalen Poly I:C-Exposition an GD 15 konnten auch mögliche Auswirkungen der postnatalen RIS-Gabe an den Tagen 34-47 auf die Quantität der Gesamt-Spines (Abb. 44a, 45a, 46, 47a, 48, jeweils Diagramm a) sowie der vier untersuchten morphologischen Subtypen Mushroom- (jeweils b), Thin- (jeweils c), Stubby- (jeweils d) und Filopodia-Spines (jeweils e) je μm Dendrit untersucht werden. Die Spine-Evaluation erfolgte sowohl für die Dendriten der präfrontal (mPFC, Abb. 44 + 45) sowie hippocampal (CA1, Abb. 48) lokalisierten Pyramidenzellen, als auch für die Zellfortsätze der striatalen (STR, Abb. 46) und accumbalen (NAcc, Abb. 47) MSNs (vgl. auch Abb. 14). An dieser Stelle ist anzumerken, dass für die Analyse des mPFC drei kortikale Subregionen zugrunde gelegt wurden. Dies waren das Areal 1 des cingulären Kortex (Cg1, Abb. 45a + b), der PrL sowie der IL. Pro Gehirnbereich und Versuchstier wurden, sofern möglich, fünf distale Dendritensegmente alternierend der rechten bzw. linken Hirnhemisphäre für die 3D-Spine-Analyse herangezogen. In Bezug auf die präfrontalen Subregionen Cg1 und PrL wurden durchschnittlich 2-3 dendritische Abschnitte fotografiert und ausgewertet. Beispielhafte Exemplare Dil-markierter, distaler Dendritensegmente derjenigen Gehirnbereiche, in denen nach pränataler Poly I:C- und/oder postnataler RIS-Behandlung signifikante Veränderungen mindestens eines Spine-Subtyps oder der Gesamt-Spinedichte ermittelt wurden, sind jeweils im Anschluss an die graphische Darstellung abgebildet (Abb. 44b, 45b, 47b).

Abb. 44a: Quantitäten der Spine-Subtypen auf distalen Dendritensegmenten im medial-präfrontalen Kortex (mPFC) nach pränataler Poly I:C- und postnataler Risperidon-Behandlung



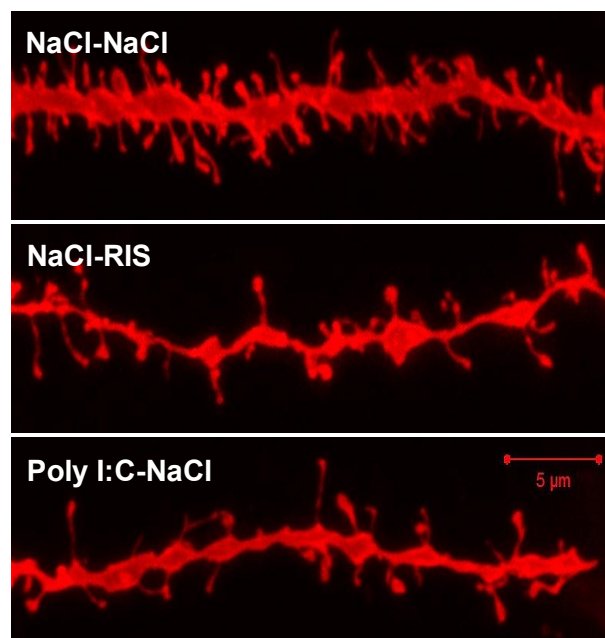
Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM sowohl der Gesamt-Spinedichte (a) als auch der Quantitäten der vier

analysierten Spine-Klassen (b-e) je μm Dendrit der Pyramidenneurone im mPFC für prä- (GD 15) und postnatal (PND 34-47) mit 0,9 % NaCl (NaCl-NaCl), pränatal mit 0,9 % NaCl und postnatal mit 0,045 mg/kg KGW RIS (Risperidon) (NaCl-RIS), pränatal mit 4 mg/kg KGW Poly I:C und postnatal mit 0,9 % NaCl (Poly I:C-NaCl) sowie pränatal mit 4 mg/kg KGW Poly I:C und postnatal mit 0,045 mg/kg KGW RIS (Poly I:C-RIS) behandelte Wistar-Ratten. Die Ziffern innerhalb der Säulen kennzeichnen die jeweilige Gruppengröße, die für alle Graphen Gültigkeit besitzt. Eine postnatale NaCl-Gabe wird jeweils anhand der weißen, eine RIS-Behandlung anhand der grauen Säulenfarbe repräsentiert. *, **: signifikant, $p < 0,05$ bzw. $< 0,01$.

Die 3D-Spine-Analyse in Verbindung mit der manuellen Postklassifikation der „undefined spines“ zeigte hinsichtlich der Gesamt-Spinedichte der Dendriten der im mPFC angesiedelten Pyramidenneurone (Abb. 44a, a) einen signifikanten Interaktionseffekt (Two-way ANOVA, ** $p = 0,0037$). Das besagt, dass die beiden Einflussfaktoren - die pränatale Vehikel- (NaCl) bzw. Poly I:C-Exposition und die postnatale NaCl- bzw. RIS-Behandlung - miteinander wechselwirkten. Im Detail ausgedrückt bewirkte die RIS-Gabe in NaCl-applizierten Jungtieren eine geringfügige Senkung der Gesamt-Spinequantität (NaCl-NaCl: $1,25 \pm 0,082$ Spines/ μm , NaCl-RIS: $0,99 \pm 0,030$ Spines/ μm ; n. s.), während sie in den *in utero* mit Poly I:C behandelten Nachkommen einen leichten Anstieg der synaptischen Dornfortsätze je μm Dendrit bedingte (Poly I:C-NaCl: $1,07 \pm 0,065$ Spines/ μm Dendrit, Poly I:C-RIS: $1,22 \pm 0,033$ Spines/ μm Dendrit; n. s.). Demzufolge resultierten aus der postnatalen RIS-Verabreichung in Abhängigkeit von der pränatalen Behandlung der Tiere gegensätzliche Effekte. Eine dementsprechende Interaktion war für die Thin-Spines ebenfalls nachweisbar (vgl. Abb. 44a, c). Auch für diese morphologische Spine-Klasse beeinflussten sich die zwei Behandlungs- bzw. Substanzfaktoren dahingehend hochsignifikant (Two-way ANOVA, *** $p = 0,0005$), dass die postnatale RIS-Gabe in den NaCl-applizierten Jungtieren eine signifikante Abnahme der Thin-Spinedichte hervorrief (Bonferronis Post-hoc Test, ** $p < 0,01$; NaCl-NaCl: $0,42 \pm 0,025$ Spines/ μm , NaCl-RIS: $0,27 \pm 0,021$ Spines/ μm), während sie in den Poly I:C-exponierten Nachkommen eine geringfügige Erhöhung bedingte (Poly I:C-NaCl: $0,32 \pm 0,018$ Spines/ μm Dendrit, Poly I:C-RIS: $0,36 \pm 0,021$ Spines/ μm Dendrit; n. s.). Der ausschlaggebende Einfluss der postnatalen Applikation auf die Spinezahl wurde durch die zweifaktorielle Varianzanalyse der Thin-Spinedaten bestätigt (* $p = 0,0444$). Ein leichter Trend ($p = 0,0627$) zu diesem Ergebnis wurde auch für die Filopodia-Spines ermittelt (NaCl-NaCl: $0,16 \pm 0,024$ Spines/ μm , Poly I:C-NaCl: $0,11 \pm 0,024$ Spines/ μm , NaCl-RIS: $0,090 \pm 0,026$ Spines/ μm , Poly I:C-RIS: $0,092 \pm 0,016$ Spines/ μm Dendrit; Abb. 44a, e).

Jedoch muss bei diesen Aussagen beachtet werden, dass die pränatale Poly I:C-Exposition (Poly I:C-NaCl) verglichen mit einer NaCl-Gabe (NaCl-NaCl) ebenfalls einen leichten Effekt hatte und sowohl die Gesamt-Spines als auch die Mehrheit der Spine-Klassen betreffend eine leichte Senkung der Spine-Dichte verursachte, welche jedoch mit Ausnahme der Thin-Spines nicht signifikant war. In Bezug auf die Thin-Spines induzierte die pränatale Poly I:C-Applikation allerdings eine signifikante Reduktion der Spine-Dichte (Bonferronis Post-hoc Test, * $p < 0,05$; NaCl-NaCl: $0,42 \pm 0,025$ Spines/ μm , Poly I:C-NaCl: $0,32 \pm 0,018$ Spines/ μm).

Abb. 44b: Beispielhafte Exemplare Dil-markierter, distaler Dendritensegmente des mPFC pränatal mit Poly I:C und postnatal mit Risperidon behandelter Wistar-Ratten

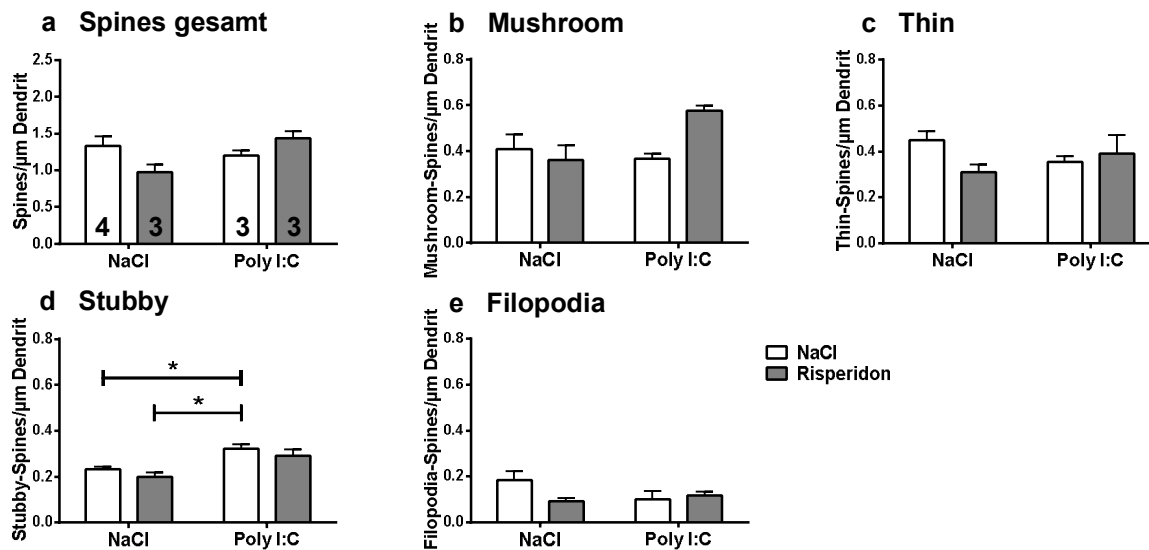


Zweidimensional zu sehen sind hier Beispiele Dil-markierter, distaler Dendritensegmente mit Spines der Pyramidenneurone des mPFC (medial-präfrontaler Kortex, unabhängig von dessen Subregion) von prä- (GD 15) und postnatal (PND 34-47) mit 0,9 % NaCl (NaCl-NaCl), pränatal mit 0,9 % NaCl und postnatal mit 0,045 mg/kg KGW RIS (Risperidon) (NaCl-RIS) sowie pränatal mit 4 mg/kg KGW Poly I:C und postnatal mit 0,9 % NaCl (Poly I:C-NaCl) behandelten Wistar-Ratten. Exemplarische Thin-Spine-Zahlen der ausgewerteten Original-3D-Bildstapel: NaCl-NaCl: 0,92 Thin-Spines/ μm ; NaCl-RIS: 0,33 Thin-Spines/ μm ; Poly I:C-NaCl: 0,27 Thin-Spines/ μm . Maßstab: 5 μm .

Zusätzlich zu der zuvor erläuterten Gesamtbetrachtung des mPFC wurde die 3D-Spine-Evaluation für die drei zugrundeliegenden Subregionen jeweils separat vorgenommen. Im Folgenden werden allerdings lediglich die Resultate des cingulären Kortex besprochen, da für den PrL keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Versuchstiergruppen

beobachtet wurden (Two-way ANOVA, Bonferroni Post-hoc Test, $p > 0,05$). Für den infralimbischen Kortex war eine statistische Analyse der Spine-Daten nicht möglich, weil nach der Entblindung der Tierzahlen für die NaCl-RIS-Gruppe keine und für die übrigen Tiergruppen zu wenig Werte vorlagen ($n = 1$ für NaCl-NaCl und Poly I:C-NaCl; $n = 2$ für Poly I:C-RIS).

Abb. 45a: Quantitäten der Spine-Subtypen auf distalen Dendritensegmenten im cingulären Kortex, Areal 1 (Cg1) nach pränataler Poly I:C- und postnataler Risperidon-Behandlung

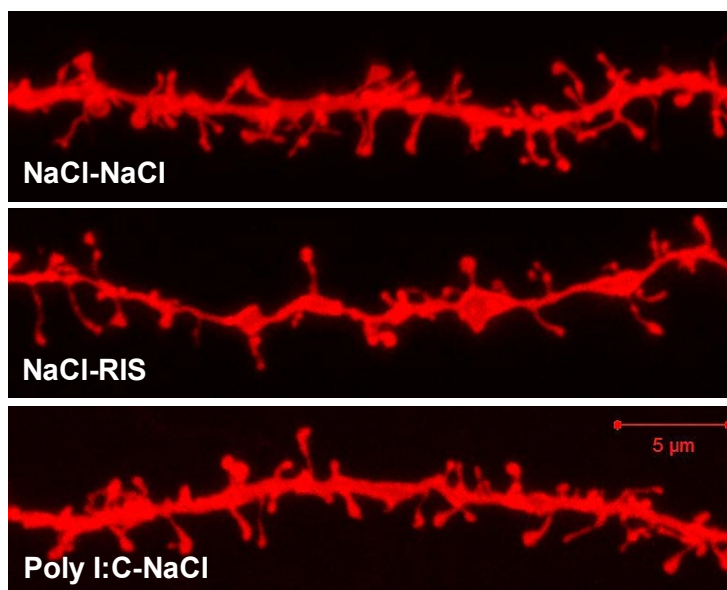


Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM sowohl der Gesamt-Spinedichte (a) als auch der Quantitäten der vier analysierten Spine-Klassen (b-e) je μm Dendrit der Pyramidenneurone in Cg1 für prä- (GD 15) und postnatal (PND 34-47) mit 0,9 % NaCl (NaCl-NaCl), pränatal mit 0,9 % NaCl und postnatal mit 0,045 mg/kg KGW RIS (Risperidon) (NaCl-RIS), pränatal mit 4 mg/kg KGW Poly I:C und postnatal mit 0,9 % NaCl (Poly I:C-NaCl) sowie pränatal mit 4 mg/kg KGW Poly I:C und postnatal mit 0,045 mg/kg KGW RIS (Poly I:C-RIS) behandelte Wistar-Ratten. Die Ziffern innerhalb der Säulen kennzeichnen die jeweilige Gruppengröße, die für alle Graphen Gültigkeit besitzt. Eine postnatale NaCl-Gabe wird jeweils anhand der weißen, eine RIS-Behandlung anhand der grauen Säulenfarbe repräsentiert. *, **: signifikant, $p < 0,05$ bzw. $< 0,01$.

In Bezug auf die Cg1-Subregion des mPFC zeigten sich, ähnlich wie für die oben erläuterte Gesamtheit des mPFC, signifikante Interaktionen zwischen prä- und postnataler Substanzgabe hinsichtlich der totalen (* $p = 0,0259$; Abb. 45a, a) sowie der Mushroom-Spinedichte (* $p = 0,0405$, jeweils Two-way ANOVA; Abb. 45a, b). In beiden Fällen führte die postnatale RIS-Behandlung in NaCl-applizierten Jungtieren zu einer leichten Verringerung der Spine-Quantität (total \rightarrow NaCl-NaCl: $1,33 \pm 0,13$ Spines/ μm , NaCl-RIS: $0,98 \pm 0,099$ Spines/ μm ; Mushroom \rightarrow NaCl-NaCl: $0,41 \pm 0,065$ Spines/ μm , NaCl-RIS: $0,36 \pm 0,065$ Spines/ μm ; n. s.), während sie in den *in utero* mit Poly I:C behandelten

Nachkommen einen schwachen Anstieg der synaptischen Dornfortsätze je μm Dendrit bedingte (total \rightarrow Poly I:C-NaCl: $1,20 \pm 0,070$ Spines/ μm , Poly I:C-RIS: $1,43 \pm 0,096$ Spines/ μm ; Mushroom \rightarrow Poly I:C-NaCl: $0,37 \pm 0,023$ Spines/ μm Dendrit, Poly I:C-RIS: $0,58 \pm 0,022$ Spines/ μm Dendrit; n. s.). Auch hier wird der gegensätzliche Effekt der postnatalen RIS-Gabe in Abhängigkeit von der gewählten *in utero*-Behandlung deutlich. Wie bereits oben für den mPFC beschrieben, induzierte die pränatale Poly I:C-Exposition (Poly I:C-NaCl) verglichen mit einer NaCl-Applikation (NaCl-NaCl) in Cg1 überwiegend eine leichte, nicht signifikante Abnahme der verschiedenen Spines. Eine Ausnahme stellten hier jedoch die Stubby-Spines (vgl. Abb. 45a, d) dar, deren Dichte nach pränataler Poly I:C-Injektion signifikant erhöht war (Bonferronis Post-hoc Test, * $p < 0,05$; NaCl-NaCl: $0,23 \pm 0,010$ Spines/ μm , Poly I:C-NaCl: $0,32 \pm 0,020$ Spines/ μm). Die postnatale RIS-Gabe zeigte unabhängig von der pränatalen Behandlung so gut wie keine Effekte auf die Stubby-Spine-Dichte (NaCl-RIS: $0,20 \pm 0,018$ Spines/ μm , Poly I:C-RIS: $0,29 \pm 0,029$ Spines/ μm), weshalb auch zwischen NaCl-RIS- und Poly I:C-NaCl-Tieren ein signifikanter Unterschied vorlag (Bonferronis Post-hoc Test, * $p < 0,05$). Diese klaren Zunahmen der Stubby-Spines verdeutlichen einen signifikanten Poly I:C-Effekt (** $p = 0,0011$, Two-way ANOVA).

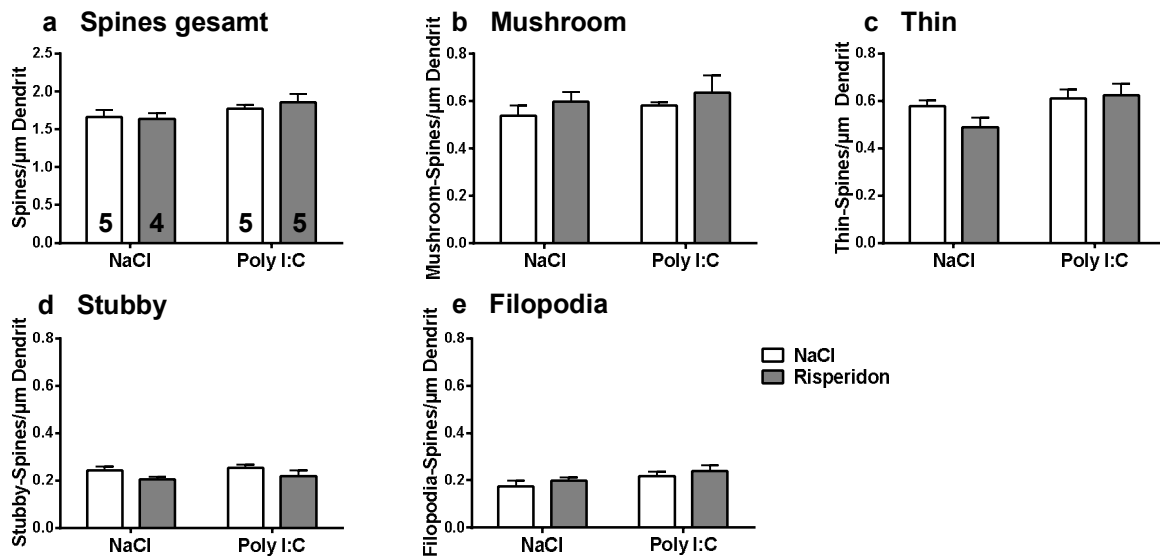
Abb. 45b: Beispielhafte Exemplare Dil-markierter, distaler Dendritensegmente in Cg1 pränatal mit Poly I:C und postnatal mit Risperidon behandelter Wistar-Ratten



In 2D-Ansicht abgebildet sind hier Beispiele Dil-markierter, distaler Dendritensegmente mit Spines der Pyramidenneurone in Cg1 (cingulärer Kortex, Areal 1) von prä- (GD 15) und postnatal (PND 34-47) mit 0,9 % NaCl (NaCl-NaCl), pränatal mit 0,9 % NaCl und postnatal mit 0,045 mg/kg KGW RIS (Risperidon) (NaCl-

RIS) sowie pränatal mit 4 mg/kg KGW Poly I:C und postnatal mit 0,9 % NaCl (Poly I:C-NaCl) behandelten Wistar-Ratten. Exemplarische Stubby-Spine-Zahlen der ausgewerteten Original-3D-Bildstapel: NaCl-NaCl: 0,17 Stubby-Spines/ μm ; NaCl-RIS: 0,19 Stubby-Spines / μm ; Poly I:C-NaCl: 0,34 Stubby-Spines/ μm . Maßstab: 5 μm .

Abb. 46: Quantitäten der Spine-Subtypen auf distalen Dendritensegmenten im dorsalen Striatum (STR) nach pränataler Poly I:C- und postnataler Risperidon-Behandlung



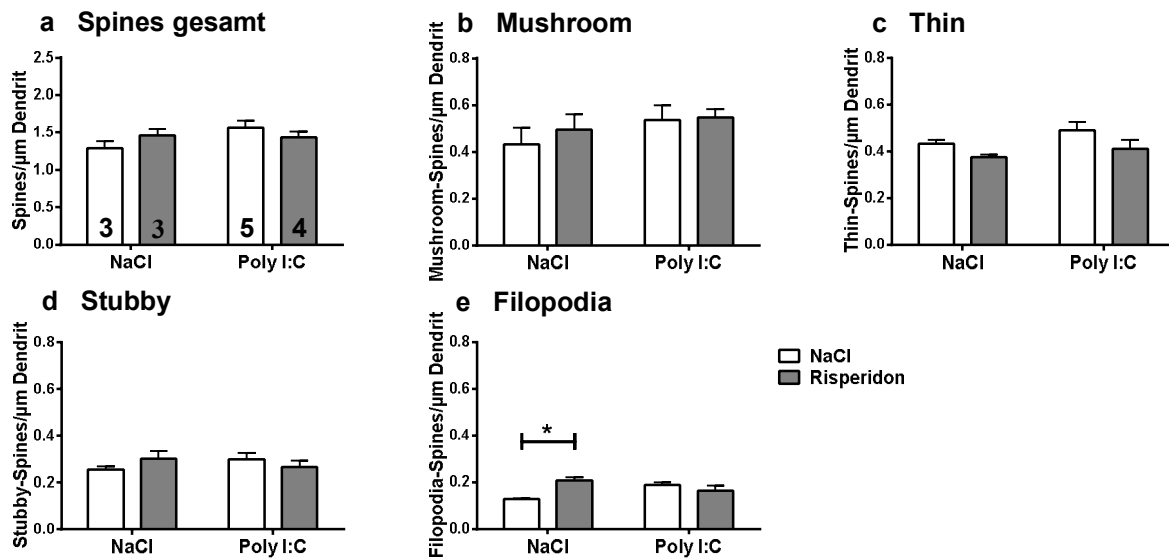
Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM sowohl der Gesamt-Spinedichte (a) als auch der Quantitäten der vier analysierten Spine-Klassen (b-e) je μm MSN-Dendrit (medium spiny neuron) im STR für prä- (GD 15) und postnatal (PND 34-47) mit 0,9 % NaCl (NaCl-NaCl), pränatal mit 0,9 % NaCl und postnatal mit 0,045 mg/kg KGW RIS (Risperidon) (NaCl-RIS), pränatal mit 4 mg/kg KGW Poly I:C und postnatal mit 0,9 % NaCl (Poly I:C-NaCl) sowie pränatal mit 4 mg/kg KGW Poly I:C und postnatal mit 0,045 mg/kg KGW RIS (Poly I:C-RIS) behandelte Wistar-Ratten. Die Ziffern innerhalb der Säulen kennzeichnen die jeweilige Gruppengröße, die für alle Graphen Gültigkeit besitzt. Eine postnatale NaCl-Gabe wird jeweils anhand der weißen, eine RIS-Behandlung anhand der grauen Säulenfarbe repräsentiert. *, **: signifikant, $p < 0,05$ bzw. $< 0,01$.

Die Dendriten der MSNs des dorsalen Striatums betreffend ließ sich hinsichtlich der Thin-Spines (Abb. 46, c) ein starker Trend (Two-way ANOVA, $p = 0,0538$) für einen Effekt der pränatalen Poly I:C-Exposition detektieren. Genauer gesagt führte die Poly I:C-Injektion *in utero* unabhängig davon, ob die Jungtiere postnatal mit NaCl oder RIS behandelt wurden, zu einer leichten, jedoch nicht statistisch signifikanten Erhöhung der Thin-Spines/ μm Dendrit (NaCl-NaCl: $0,58 \pm 0,023$ Spines/ μm , Poly I:C-NaCl: $0,61 \pm 0,038$ Spines/ μm , NaCl-RIS: $0,49 \pm 0,038$ Spines/ μm , Poly I:C-RIS: $0,62 \pm 0,051$ Spines/ μm Dendrit). Auch für die Filopodia-Spines (Abb. 46, e) konnte ein geringfügiger Anstieg ihrer Quantität nach Poly I:C-Verabreichung *in utero* ermittelt werden (NaCl-NaCl: $0,18 \pm 0,023$ Spines/ μm ,

Poly I:C-NaCl: $0,22 \pm 0,020$ Spines/ μm , NaCl-RIS: $0,20 \pm 0,014$ Spines/ μm , Poly I:C-RIS: $0,24 \pm 0,024$ Spines/ μm Dendrit), wobei hier nur ein schwacher Trend ($p = 0,0685$, Two-way ANOVA) vorlag. Außerdem wurde hinsichtlich der Stubby-Spines ein signifikanter Effekt der postnatalen RIS-Applikation festgestellt (* $p = 0,0469$; Abb. 46, d). Ungeachtet der Abstammung der Jungtiere bewirkte die Verabreichung des Antipsychotikums eine leichte Reduktion der Stubby-Spine-Dichte/ μm Dendrit (NaCl-NaCl: $0,24 \pm 0,017$ Spines/ μm , NaCl-RIS: $0,20 \pm 0,012$ Spines/ μm , Poly I:C-NaCl: $0,25 \pm 0,012$ Spines/ μm , Poly I:C-RIS: $0,22 \pm 0,022$ Spines/ μm Dendrit). Hierbei ist jedoch zu vermerken, dass die Post-hoc Tests (Bonferroni) keine Signifikanz offenlegten.

Auch der laterale Globus pallidus wurde für die 3D-Spine-Evaluation herangezogen. Aufgrund der aus der Entblindung der Tierzahlen folgenden mehrheitlich unzureichenden Werte je Versuchsgruppe ($n = 1$ für NaCl-NaCl, Poly I:C-NaCl und NaCl-RIS; $n = 4$ für Poly I:C-RIS) konnte eine statistische Auswertung der Daten jedoch nicht erfolgen.

Abb. 47a: Quantitäten der Spine-Subtypen auf distalen Dendritensegmenten in der Schalenregion des Nukleus accumbens nach pränataler Poly I:C- und postnataler Risperidon-Behandlung

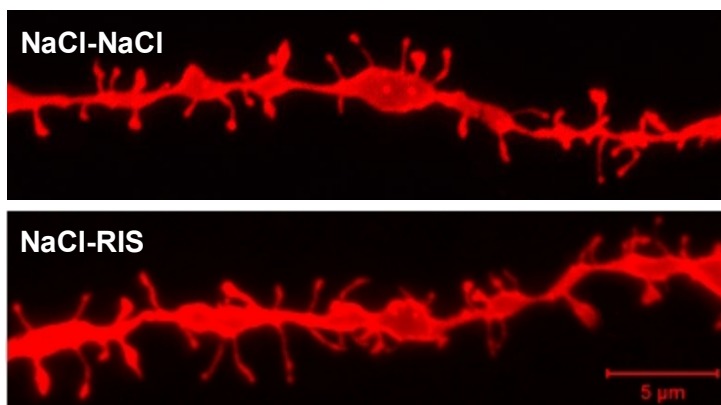


Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM sowohl der Gesamt-Spinedichte (a) als auch der Quantitäten der vier analysierten Spine-Klassen (b-e) je μm MSN-Dendrit (medium spiny neuron) in der Schalenregion des NAcc für prä- (GD 15) und postnatal (PND 34-47) mit 0,9 % NaCl (NaCl-NaCl), pränatal mit 0,9 % NaCl und postnatal mit 0,045 mg/kg KGW RIS (Risperidon) (NaCl-RIS), pränatal mit 4 mg/kg KGW Poly I:C und postnatal mit 0,9 % NaCl (Poly I:C-NaCl) sowie pränatal mit 4 mg/kg KGW Poly I:C und postnatal mit 0,045 mg/kg KGW RIS (Poly I:C-RIS) behandelte Wistar-Ratten. Die Ziffern innerhalb der Säulen kennzeichnen die jeweilige Gruppengröße, die für alle Graphen Gültigkeit besitzt. Eine postnatale NaCl-Gabe wird jeweils

anhand der weißen, eine RIS-Behandlung anhand der grauen Säulenfarbe repräsentiert. *: signifikant, $p < 0,05$.

In Hinblick auf die im NAcc angesiedelten mittelgroßen, bedornten Projektionsneurone konnte für die Filopodia-Spines innerhalb der Schalenregion des NAcc (s. Abb. 47a, e) eine signifikante Interaktion zwischen prä- und postnataler Behandlung nachgewiesen werden (** $p = 0,0057$, Two-way ANOVA). Anders als bei der festgestellten Substanz-Wechselwirkung innerhalb des mPFC (s. o. Abb. 44a + 45a) führte die postnatale RIS-Behandlung in NaCl-applizierten Jungtieren hier zu einer signifikanten Zunahme der Filopodia-Spine-Quantität (* $p < 0,05$, Bonferronis Post-hoc Test; NaCl-NaCl: $0,13 \pm 0,0036$ Spines/ μm , NaCl-RIS: $0,21 \pm 0,013$ Spines/ μm), während sie in den *in utero* mit Poly I:C exponierten Nachkommen eine leichte Senkung der Filopodia-Spines je μm Dendrit bedingte (Poly I:C-NaCl: $0,19 \pm 0,012$ Spines/ μm , Poly I:C-RIS: $0,16 \pm 0,021$ Spines/ μm ; n. s.). Auch hier hängt der Effekt der postnatalen RIS-Gabe von der gewählten pränatalen Behandlung ab. Ebenfalls anders als im mPFC (vgl. Abb. 44a + 45a) verursachte die *in utero*-Exposition mit Poly I:C (Poly I:C-NaCl) gegenüber einer NaCl-Applikation (NaCl-NaCl) bezüglich aller Spine-Klassen eine geringfügige, nicht signifikante Zunahme der Spine-Dichte.

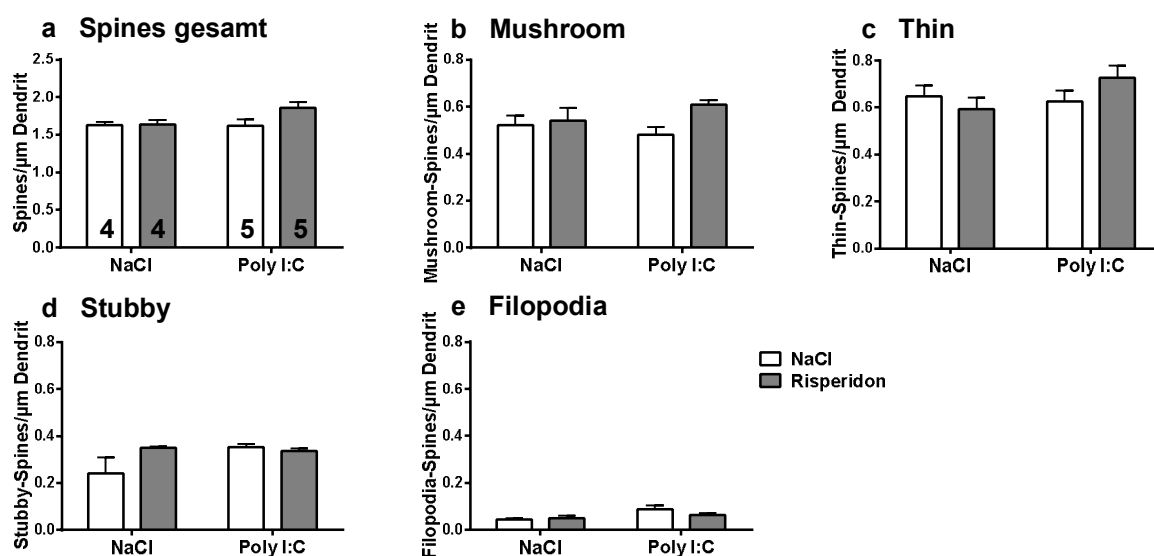
Abb. 47b: Beispielhafte Exemplare Dil-markierter, distaler Dendritensegmente im NAcc (Schalenregion) pränatal mit Poly I:C und postnatal mit Risperidon behandelter Wistar-Ratten



Zweidimensional dargestellt sind hier Beispiele Dil-markierter, distaler Dendritensegmente mit Spines der MSN's (medium spiny neurons) in der Schalenregion des Nukleus accumbens (NAcc) von prä- (GD 15) und postnatal (PND 34-47) mit 0,9 NaCl (NaCl-NaCl) sowie pränatal mit 0,9 % NaCl und postnatal mit 0,045 mg/kg KGW RIS (Risperidon) (NaCl-RIS) behandelten Wistar-Ratten. Exemplarische Filopodia-Spine-Zahlen der ausgewerteten Original-3D-Bildstapel: NaCl-NaCl: 0,06 Filopodia-Spines/ μm ; NaCl-RIS: 0,25 Filopodia-Spines/ μm . Maßstab: 5 μm .

Nicht nur für die Schalenregion des NAcc sondern auch für dessen Kerngebiet wurde die 3D-Spine-Analyse vorgenommen. Die statistische Prüfung (Two-way ANOVA, Bonferroni Post-hoc Tests) der gewonnenen Daten lieferte allerdings keinerlei signifikante Differenzen zwischen den vier unterschiedlich behandelten Tiergruppen NaCl-NaCl, NaCl-RIS, Poly I:C-NaCl und Poly I:C-RIS ($p > 0,05$), weshalb auf die Ausführung dieser Befunde verzichtet wird.

Abb. 48: Quantitäten der Spine-Subtypen auf apikalen, distalen Dendritensegmenten in der hippocampalen CA1-Region nach pränataler Poly I:C- und postnataler Risperidon-Behandlung



Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM sowohl der Gesamt-Spinedichte (a) als auch der Quantitäten der vier analysierten Spine-Klassen (b-e) je μm apikaler Dendrit der hippocampalen Pyramidenneurone in CA1 (Cornu Ammonis, Areal 1) für prä- (GD 15) und postnatal (PND 34-47) mit 0,9 % NaCl (NaCl-NaCl), pränatal mit 0,9 % NaCl und postnatal mit 0,045 mg/kg KGW RIS (Risperidon) (NaCl-RIS), pränatal mit 4 mg/kg KGW Poly I:C und postnatal mit 0,9 % NaCl (Poly I:C-NaCl) sowie pränatal mit 4 mg/kg KGW Poly I:C und postnatal mit 0,045 mg/kg KGW RIS (Poly I:C-RIS) behandelte Wistar-Ratten. Die Ziffern innerhalb der Säulen kennzeichnen die jeweilige Gruppengröße, die für alle Graphen Gültigkeit besitzt. Eine postnatale NaCl-Gabe wird jeweils anhand der weißen, eine RIS-Behandlung anhand der grauen Säulenfarbe repräsentiert. *: signifikant, $p < 0,05$.

Bezüglich der apikal orientierten Dendriten der in der hippocampalen CA1-Region lokalisierten Pyramidenneurone resultierte aus der statistischen Auswertung (Two-way ANOVA, Bonferroni Post-hoc Tests) der Daten der 3D-Spine-Analyse ein signifikanter Effekt der pränatalen Poly I:C-Exposition auf die Filopodia-Spines (* $p = 0,0349$; Abb. 48, e). Das bedeutet, ungeachtet der postnatalen NaCl- bzw. RIS-Behandlung führte die Poly

I:C-Gabe zu einer leichten, jedoch nicht statistisch signifikanten Erhöhung der Filopodia-Spines/ μm Dendrit (NaCl-NaCl: $0,045 \pm 0,0048$ Spines/ μm , Poly I:C-NaCl: $0,087 \pm 0,017$ Spines/ μm , NaCl-RIS: $0,051 \pm 0,0094$ Spines/ μm , Poly I:C-RIS: $0,064 \pm 0,0079$ Spines/ μm Dendrit). Ähnliches wurde auch schon für die Thin- und Filopodia-Spines der MSNs im dorsalen Striatum beobachtet (s. o.).

Darüber hinaus zeigte sich für die Dichte der Mushroom-Spines auf den apikalen Dendriten der CA1-Pyramidenzellen (s. Abb. 48, b) ein leichter Trend ($p = 0,0642$) für eine quantitative Erhöhung dieser Spine-Klasse nach postnataler RIS-Gabe unabhängig von der pränatalen Behandlung (NaCl-NaCl: $0,52 \pm 0,042$ Spines/ μm , Poly I:C-NaCl: $0,48 \pm 0,034$ Spines/ μm , NaCl-RIS: $0,54 \pm 0,054$ Spines/ μm , Poly I:C-RIS: $0,61 \pm 0,019$ Spines/ μm Dendrit). In Hinblick auf die Stubby-Spines (Abb. 48, d) wurde zudem ein schwacher Trend ($p = 0,0693$) für einen Interaktionseffekt ermittelt. Das bedeutet, dass die Wirkung der postnatalen RIS-Gabe in Abhängigkeit von der pränatalen Substanzinjektion zu entgegengesetzten Ergebnissen führte. Im Detail ausgedrückt bewirkte die RIS-Behandlung in NaCl-applizierten Jungtieren eine leichte Steigerung der Stubby-Spine-Dichte (NaCl-NaCl: $0,24 \pm 0,069$ Spines/ μm , NaCl-RIS: $0,35 \pm 0,0054$ Spines/ μm , n. s.), während sie in Poly I:C-exponierten Ratten eine minimale quantitative Senkung dieser Spines hervorrief (Poly I:C-NaCl: $0,35 \pm 0,013$ Spines/ μm Dendrit, Poly I:C-RIS: $0,34 \pm 0,013$ Spines/ μm Dendrit; n. s.).

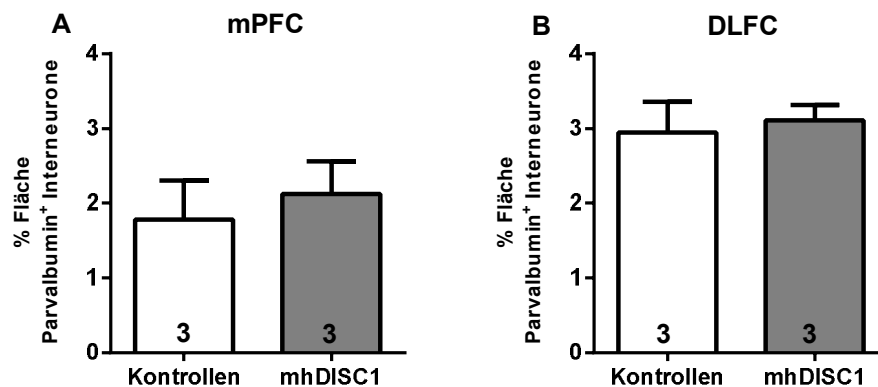
Bezugnehmend auf die basalen Dendriten hippocampaler Pyramidenneurone in CA1 ließen sich weder für die pränatale Poly I:C-Exposition noch für die postnatale RIS-Behandlung signifikante Unterschiede zwischen den NaCl-NaCl-, NaCl-RIS-, Poly I:C-NaCl- und Poly I:C-RIS-Tieren nachweisen (Two-way ANOVA, Bonferroni Post-hoc Tests, $p > 0,05$), weshalb diese Resultate hier nicht näher beschrieben werden.

5.5.3 Genetische Induktion Schizophrenie-typischer Symptome mittels Expression des mutierten humanen *DISC1*-Gens (disrupted-in-schizophrenia-1)

In der vorliegenden Arbeit wurde das mh*DISC1*-Modell der Schizophrenie verwendet, um durch die induzierbare Expression des mutierten humanen *DISC1*-Gens im Vorderhirn von Mäusen einen genetischen Risikofaktor für die Entstehung von Schizophrenie im Tiermodell abzubilden. Das *DISC1*-Gen ist an der neuronalen Entwicklung, wie beispielsweise an der Reifung von Dendriten sowie der Synaptogenese beteiligt, weshalb dessen Mutation in Form einer balancierten Translokation Anomalien in Entwicklung, Morphologie und Funktion des Gehirns auslösen kann. Hier wurden männliche 7,5 Monate alte doppeltransgene mh*DISC1*-Mäuse (CaMKII-tTA x tet-h*DISC1*) und deren einzeltransgene Kontrollen (CaMKII-tTA) eingesetzt, um einerseits PV⁺ Interneurone in verschiedenen Gehirnregionen zu quantifizieren, andererseits um die Anzahl der auf den hippocampalen Körnerzeldendriten lokalisierten synaptischen Dornfortsätze zweidimensional zu evaluieren.

5.5.3.1 Quantifizierung kortikaler PV⁺ Interneurone in mh*DISC1*-Mäusen

Die Säulendiagramme der folgenden Abbildung 49, A+B veranschaulichen die Resultate der immunhistochemischen Interneuron-Quantifizierung anhand des prozentualen Anteils der PV⁺ Interneurone an der jeweils analysierten Gesamtfläche des mPFC (A) sowie des DLFC (B) in doppeltransgenen mh*DISC1*-Mäusen (CaMKII-tTA x tet-h*DISC1*) gegenüber einzeltransgenen Kontrollen (CaMKII-tTA). Die Erfassung der PV-immunreaktiven Interneurone des mPFC basierte dabei auf der Analyse des PrL, während für die Quantifizierung selbiger Zellen im DLFC das M1-Areal als Grundlage diente. Für beide Hirnareale wurden pro Versuchstier überwiegend jeweils fünf konsekutive Schnitte (6 Serien) für die histologische Auswertung herangezogen. Da das gesamte Gehirn dafür zur Verfügung stand, wurden je Hemisphäre fünf Schnitte analysiert und daraus schließlich der Gesamtmittelwert gebildet.

Abb. 49: Quantifizierung der PV⁺ Interneurone kortikaler Hirnregionen in mhDISC1-Mäusen

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der prozentualen Anteile der PV⁺ Interneurone an der jeweils analysierten Gesamtfläche des medial-präfrontalen (A; mPFC) und dorsolateral-frontalen Kortex (B; DLFC) für einzeltransgene CaMKII-tTA-Mäuse (Kontrollen) gegenüber bitransgenen mhDISC1-Mäusen (CaMKII-tTA x tet-hDISC1). Die Ziffern innerhalb der Säulen kennzeichnen die jeweilige Gruppengröße.

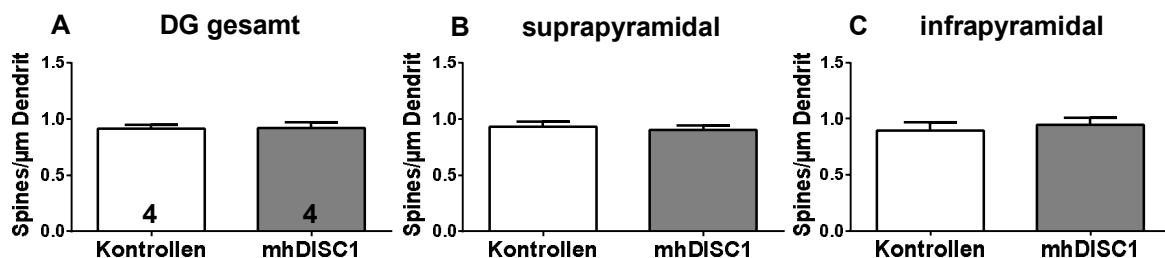
Die statistische Auswertung der Quantifizierung PV⁺ Interneurone lieferte weder für den mPFC (u. z.s. t-Test, $p = 0,6437$; A) noch für den DLFC (u. z.s. t-Test, $p = 0,7395$; B) einen signifikanten Genotyp-Unterschied zwischen den einzeltransgenen Kontrollen (mPFC: 1,79 % \pm 0,52 %; DLFC: 2,95 % \pm 0,41 %) und den bitransgenen mhDISC1-Mäusen (mPFC: 2,13 % \pm 0,43 %; DLFC: 3,11 % \pm 0,20 %). Allerdings ist aus den voranstehenden Graphiken klar ersichtlich, dass im DLFC (B) mehr PV⁺-Interneurone immunhistochemisch markiert wurden als im mPFC (A). Demnach bedeckten diese GABAergen Interneurone im DLFC, verglichen mit dem mPFC, ca. 39 % (Kontrollen) bzw. 32 % (mhDISC1) mehr von der jeweils untersuchten Gesamtfläche.

5.5.3.2 Untersuchung synaptischer Dornfortsätze des Gyrus dentatus in mhDISC1-Mäusen

Des Weiteren wurden die Gesamtzahlen der synaptischen Dornfortsätze distaler Dendritensegmente im DG der rechten Hirnhemisphäre von bitransgenen mhDISC1-Mäusen (CaMKII-tTA x tet-hDISC1) sowie einzeltransgenen Kontrollen (CaMKII-tTA) unter Anwendung des Definiens-2D-Algorithmus automatisiert eruiert. Da zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Studie der automatisierte 3D-Algorithmus des Spine-Analyse-Moduls noch nicht etabliert war, wurde hier das „Vorgängerverfahren“, nämlich die automatisierte Spine-Quantifizierung, eingesetzt. Neben der Gesamtbetrachtung der distalen Körnerzellendriten (DG gesamt; Abb. 50, A), deren Perikarya im Stratum granulosum

angesiedelt sind, erfolgte zusätzlich die Differenzierung dieser Zellfortsätze in die suprapyramidal, d. h. im dorsalen Blatt des DG gelegenen Dendriten (B) und in die infrapyramidal, d. h. im ventralen Blatt des DG lokalisierten Dendriten (C). Bis auf vereinzelte Ausnahmen, für die nur drei bzw. vier Dendritenabschnitte fotografiert und ausgewertet werden konnten, wurden je Versuchstier sowohl fünf supra- als auch fünf infrapyramidal lokalisierte Dendritensegmente für die 2D-Spine-Analyse zugrunde gelegt. Für jedes Tier wurden die Mittelwerte beider Subregionen summiert, woraus sich die Gesamt-Spinezahl des DG (DG gesamt) ergab.

Abb. 50: Automatisch erfasste 2D-Spine-Zahlen distaler Dendritensegmente der Körnerzellen im Gyrus dentatus von mhDISC1-Mäusen



Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM sowohl der Gesamt-Spinedichte des Gyrus dentatus (DG, A) als auch der Spine-Zahlen differenziert nach supra- (B) bzw. infrapyramidalen (C) Lokalisation der Körnerzellendendriten für einzeltransgene Kontrollen (CaMKII-tTA-Mäuse) gegenüber bitransgenen mhDISC1-Mäusen (CaMKII-tTA x tet-hDISC1). Die Angaben beziehen sich jeweils auf 1 μ m Körnerzell-Dendrit. Die Ziffern innerhalb der Säulen kennzeichnen die jeweilige Gruppengröße, die für alle Graphen Gültigkeit besitzt.

In Hinblick auf die Gesamt-Spinedichte der distalen Körnerzellendendriten wurden für die Kontroll- und mhDISC1-Mäuse mit $0,91 \pm 0,039$ Spines/ μ m Dendrit und $0,92 \pm 0,052$ Spines/ μ m Dendrit nahezu identische Werte ermittelt (u. z.s. t-Test, $p = 0,8824$; A). Dementsprechend konnten auch bezüglich der sich infrapyramidal bzw. suprapyramidal erstreckenden Dendriten keine Transgen-induzierten Unterschiede zwischen den beiden Tiergruppen ermittelt werden. So wurden für die infrapyramidalen Zellfortsätze $0,93 \pm 0,045$ Spines/ μ m Dendrit (Kontrollen) bzw. $0,90 \pm 0,042$ Spines/ μ m Dendrit (mhDISC1; $p = 0,6491$) detektiert (B), für die suprapyramidal orientierten Zellausläufer waren es $0,89 \pm 0,075$ Spines/ μ m Dendrit (Kontrollen) bzw. $0,94 \pm 0,065$ Spines/ μ m Dendrit (mhDISC1; $p = 0,6370$; C).

6. Diskussion

Die vorliegende Dissertation setzt sich aus zwei aufeinander aufbauenden Einzelprojekten zusammen. Im ersten Arbeitsabschnitt wurde die Gene Gun-Methode zur Markierung synaptischer Dornfortsätze (Spines) unter Verwendung des murinen APPSWE-Modells des Morbus Alzheimer etabliert. Damit wurden zwei Ziele verfolgt: 1. Etablierung und Validierung der ballistischen Fluoreszenzmarkierung synaptischer Dornfortsätze via Gene Gun und Substitution der bis dato in der Arbeitsgruppe für die Spine-Untersuchung angewandten Golgi-Cox-Färbung, 2. Etablierung und Validierung eines 3D-Algorithmus für die Automatisierung der dreidimensionalen Spine-Analyse.

Nach der Methoden-Validierung wurde diese im zweiten Teil der Arbeit eingesetzt, um in verschiedenen präklinischen Tiermodellen der Schizophrenie mögliche Alterationen der Spines zu evaluieren. Neben der neuroanatomischen Betrachtung der Gehirne, die zudem eine immunhistologische Auswertung GABAerger Interneurone einschloss, wurde ein Teil der Tiere außerdem mit Hilfe des OF-Tests auf lokomotorische Hyperaktivität als Korrelat eines Positivsymptoms der Schizophrenie untersucht.

6.1 Etablierung einer optimierten Methode zur Analyse synaptischer Dornfortsätze

Für die Etablierung der ballistischen Fluoreszenzmarkierung synaptischer Dornfortsätze via Gene Gun wurden distale Segmente basaler CA1-Pyramidenzellendriten in transgenen APPSWE-Mäusen gegenüber WT-Kontrollen untersucht (vgl. Ergebnisse, Abschnitt 5.3). Das APPSWE-Modell wurde deshalb gewählt, weil hierfür bereits vor der Anfertigung dieser Dissertation Erfahrungswerte für die Spine-Analyse auf Basis Golgi-gefärbter Koronarschnitte existierten (PEREZ-CRUZ et al., 2011) und diese als Referenz herangezogen werden konnten. Der Austausch der Golgi-Färbung durch das Gene Gun-Verfahren wurde aufgrund vielfacher Vorteile letzterer Technik angestrebt. So bot die ballistische Zell- bzw. Spine-Markierung zum einen die Möglichkeit der 3D-Auswertung mittels konfokaler Laser Scanning-Mikroskopie im Gegensatz zur 2D-Evaluation Golgi-gefärbter Spines am Lichtmikroskop. In Zusammenhang damit wurden zum anderen eine realistischere Quantifizierung sowie eine weitaus präzisere Klassifizierung der Spines gewährleistet. Während v. a. wegen der lichtmikroskopischen 2D-Aufnahmen Golgi-gefärbter Spines mit dieser Methode primär nur Mushroom- und Filopodia-Spines zweifelsfrei identifiziert werden konnten, erlaubten die 3D-Bildstapel Gene Gun-markierter

Spines darüber hinaus die eindeutige Differenzierung von z. B. Thin- und Stubby-Spines. Um die Substituierbarkeit der zeitintensiven Golgi-Färbung durch die weniger aufwändige Gene Gun-Technik zu eruieren, war es zunächst erforderlich, die mittels manueller Auswertung gewonnenen Resultate beider Verfahren miteinander zu vergleichen. Bei dieser Gegenüberstellung fiel auf, dass die Golgi-Färbung insbesondere bei der Quantifizierung der morphologischen Spine-Subtypen (Mushroom, Filopodia) wesentlich höhere Zahlen lieferte als die Gene Gun-Markierung. Diese Überschätzung der Subtypen lässt sich damit begründen, dass die mit der Golgi-Färbung verbundene eingeschränkte Betrachtung der Spine-Morphologie zu einer nicht unerheblichen Fehlklassifikation führte, so dass z. B. Thin-Spines, die sich wie die Mushrooms durch Kopf und Hals auszeichnen, fälschlicherweise der Mushroom-Klasse zugewiesen wurden. Auch bezüglich der hohen Filopodia-Zahl erscheint eine morphologische Fehlbeurteilung plausibel. Während der Betrachter die Golgi-gefärbten Spines nur per Aufsicht wahrnahm, ermöglichten die LSM-Bildstapel Gene Gun-markierter Dendriten eine Fokussierung durch die z-Ebene. Dadurch wurden Strukturen sichtbar, die möglicherweise über oder unter dem mutmaßlichen Filopodium lokalisiert, unter Umständen sogar mit diesem verschmolzen waren. Ließ sich der Spine beim Fokussieren nicht mehr eindeutig der Filopodia-Klasse zuweisen, weil er entweder in einen Komplex mit mindestens einem weiteren Spine eingebunden war oder die Einbeziehung benachbarter optischer Schnitte des z-Stapels eine ungewöhnliche, nicht zuordenbare Morphologie offenlegte, wurde er als „undefined spine“ und nicht als Filopodium eingestuft. Im Vergleich zur Lichtmikroskopie stellt die Laser Scanning Mikroskopie also nicht nur eine genauere Erkennbarkeit von Spine-Form und -Größe sicher, sondern offenbart auch solche Spines, die von anderen markierten Strukturen überlagert werden oder sich in anderen Fokusebenen befinden. Diese präzisere Betrachtungs- und Beurteilungsmöglichkeit der synaptischen Dornfortsätze kann ebenfalls als Begründung dafür angeführt werden, dass die in den APPSWE-Mäusen im Vergleich zu WT-Kontrollen anhand der 2D-Auswertung nachgewiesene signifikante Reduktion der Filopodia-Spines nach Durchführung der 3D-Analyse nicht festzustellen war. Sowohl für die Gesamt-Spinedichte als auch für die Anzahl der Mushroom-Spines ergaben sich keine Abweichungen zwischen den Resultaten beider Spine-Analyse-Verfahren; genauer gesagt, zeigten beide Methoden keinen Transgen-Effekt. Wegen der zuvor erläuterten Diskrepanzen in der Spine-Identifizierung und -Klassifizierung stellte die zwei- bzw. dreidimensional ermittelte Gesamt-Spinedichte die primäre Bezugsgröße für die Beurteilung der Austauschbarkeit der beiden Spine-Analyse-Verfahren dar. Da hinsichtlich

der Spine-Gesamtzahl der Kontrolltiere beide Analyseformen vergleichbare Resultate lieferten, wurde von der Substituierbarkeit der Golgi-Färbung durch die Gene Gun-Technik ausgegangen.

Nach der Verifizierung der Gene Gun als Methode der Wahl zur Visualisierung synaptischer Dornfortsätze wurde zunächst für die automatisierte Spine-Quantifizierung ein 2D-Algorithmus für das Spine-Analyse-Modul entwickelt. Die statistische Korrelationsanalyse zwischen den manuell evaluierten und den automatisch gewonnenen Gesamt-Spinezahlen zeigte sowohl für die transgenen APPSWE-Mäuse als auch für die WT-Kontrollen einen hoch-signifikanten linearen Zusammenhang. Die positiven Korrelationskoeffizienten besagen, dass eine hohe bzw. niedrige manuell und dreidimensional ermittelte Spinedichte pro Versuchstier mit einer entsprechend hohen bzw. niedrigen automatisch und zweidimensional bestimmten Spinezahl zusammenhing. Folgerichtig ließ sich auch mit Hilfe der automatisierten Spine-Quantifizierung kein Transgen-Effekt der APPSWE-Mäuse gegenüber ihren Kontrollen detektieren. Für beide Versuchstiergruppen resultierte jedoch aus der manuellen 3D-Analyse eine etwa 1,7x höhere Gesamt-Spinezahl als aus der automatischen 2D-Quantifizierung. Dadurch, dass bei der 3D-Auswertung die Informationen der dritten Dimension, d. h. die in der z-Ebene lokalisierten Spines, auf Basis der optischen Schnitte (3D-Bildstapel) eingeschlossen wurden, entsprach dieser Befund den Erwartungen. Dies wie insbesondere das positive Ergebnis der Korrelationsanalyse verwiesen auf eine Konformität zwischen den beiden auf der ballistischen Fluoreszenzmarkierung beruhenden Spine-Quantifizierungsverfahren und bestätigten die Anwendbarkeit des 2D-Algorithmus des Spine-Analyse-Moduls für künftige Spine-Zählungen.

Dementsprechend wurde die automatisierte 2D-Spine-Analyse nach ihrer Etablierung für das murine APPSWE-Modell des Morbus Alzheimer in der Amphetamin-Studie erstmalig für ein präklinisches Tiermodell der Schizophrenie eingesetzt. In Verbindung damit wurde auf dem etablierten 2D-Algorithmus aufbauend unter Einbezug der für jede Spine-Klasse charakteristischen Differenzierungskriterien der 3D-Algorithmus entwickelt. Mit dessen Hilfe konnten die Spines schließlich nicht nur automatisch quantifiziert sondern auch gemäß ihrer Morphologie differenziert und einer der vier Klassen - Mushroom-, Thin-, Stubby-, Filopodia-Spines - zugeordnet werden (Klassifizierung). Demnach diene das AMPH-Modell der Schizophrenie einerseits dazu, die Anwendbarkeit der etablierten 2D-Methode auf ein Rattenmodell sowie auf diverse Hirnregionen zu bestätigen und andererseits die automatisierte 3D-Auswertung der synaptischen Dornfortsätze zu testen

und zu validieren. Mit Hilfe einer statistischen Korrelationsanalyse konnte die Konformität der automatisch evaluierten 2D- und 3D-Gesamt-Spinezahlen verifiziert werden. Mit Ausnahme der apikalen Dendriten der CA1-Pyramidenzellen der akut mit AMPH behandelten Tiere (nicht signifikant) ergaben sich für alle evaluierten Gehirnnareale beider Versuchstiergruppen (akut, subchronisch) mindestens signifikante, überwiegend sogar hochsignifikante positive lineare Abhängigkeiten. Da folglich die Ergebnisse der automatisierten 3D- mit denen der automatisierten 2D-Spine-Quantifizierung übereinstimmten, galt sowohl die auf der Definiens-Software beruhende 3D-Spine-Analyse als auch deren Anwendbarkeit auf diverse Areale des Gehirns sowie verschiedene präklinische Tiermodelle als validiert. Somit wurden die zwei Ziele des ersten Arbeitsabschnitts der vorliegenden Dissertation - die Entwicklung eines automatisierten 3D-Analyseverfahrens für synaptische Dornfortsätze sowie die Substitution der bis dato für die Spine-Untersuchung angewandten Golgi-Cox-Färbung - erfolgreich erreicht.

6.1.1 Beurteilung der automatisierten 3D-Spine-Analyse

Zwar wurde die 3D-Spine-Analyse aufgrund ihrer Automatisierung erheblich erleichtert, jedoch ist an dieser Stelle anzumerken, dass in der Überzahl der automatisch ausgewerteten konfokalen Bilder ein Teil der Dornfortsätze von dem Analyseprogramm als „undefined spines“ deklariert wurde. Das bedeutet, dass diese Spines aufgrund ihrer ungewöhnlichen Morphologie von dem 3D-Algorithmus des Spine-Analyse-Moduls keiner der vier definierten Subtypen zugeteilt werden konnten und daher manuell nachklassifiziert werden mussten - soweit dies möglich war und es sich nicht um Komplexe aus zwei oder mehr Spines handelte. Aus diesem Grund ist es korrekter, die Software-gestützte 3D-Spine-Analyse als semiautomatisch zu bezeichnen. Die Anzahl der von der Software nicht klassifizierten Dornfortsätze je Aufnahme war abhängig von der Hirnregion und sowohl für striatale als auch für accumbale MSN-Dendriten am höchsten, für hippocampale Pyramidenzellendendriten hingegen am geringsten. Diese Beobachtung lässt sich mit dem allgemeinen Erscheinungsbild der Spines, das zwischen den einzelnen Gehirnnarealen variiert (HARRIS & KATER, 1994; KIM et al., 2009), in Verbindung bringen. Vor allem im Striatum und NAcc wurden zum einen zahlreiche auffällig geformte, zum anderen viele lange und dünne Spines detektiert, was die in diesen Strukturen nachgewiesene höchste Anzahl an Filopodia-Spines erklärt. In Übereinstimmung damit fanden auch SHEN et al. (2008), die ebenfalls die diolistische Fluoreszenzmarkierung zur Spine-Visualisierung

einsetzen, eine sehr komplexe, irreguläre Morphologie accumbaler MSN-Spines. Im Gegensatz dazu waren die Spines der CA1-Pyramidenneurone erstens wesentlich kleiner und kürzer und zeigten zweitens kaum morphologische Unregelmäßigkeiten. Zudem lagen im Hippokampus deutlich weniger Filopodia-Spines vor. Konsistent ließ sich feststellen, dass nicht nur in allen untersuchten präklinischen Tiermodellen, sondern auch in allen evaluierten Gehirnregionen generell Mushroom- und Thin-Spines dominierten. Dies steht in Einklang mit der Aussage, dass es sich bei diesen beiden Subtypen um reife Spines handelt, die stabile Synapsen beherbergen (SORRA & HARRIS, 2000; POLLEUX & GHOSH, 2008) und folglich im adulten Gehirn vorherrschend zu finden sind (HERING & SHENG, 2001). Auf die spezifischen Befunde der Spine-Analyse wird in der Ergebnis-Diskussion der verschiedenen Tiermodelle der Schizophrenie nochmals gesondert eingegangen (s. Abschnitt 6.3).

Zusammenfassend lässt sich schließen, dass die diolistische Fluoreszenzmarkierung synaptischer Dornfortsätze in Verbindung mit der Aufnahme dreidimensionaler Bildstapel am LSM sowie der automatisierten 3D-Spine-Analyse mit Hilfe der Definiens Architect XD-Software der 2D-Spine-Evaluation auf Basis der Golgi-Cox-Färbung vorzuziehen ist. Das Gene Gun-Verfahren bietet im Vergleich zur Golgi-Methode folgende entscheidende Vorteile: 1. einfachere und für den Experimentator ungefährlichere Handhabung (weniger toxische Reagenzien), 2. Zeitersparnis in Bezug auf die Spine-Visualisierung und die Anfertigung der Bildaufnahmen, 3. realitätsgetreuere Spine-Quantifizierung, 4. präzisere Spine-Klassifikation. Nichtsdestotrotz sind die stark variable Effizienz der diolistischen Fluoreszenzmarkierung, welche durch den Experimentator nicht zu beeinflussen ist und teilweise eine geringe Ausbeute auswertbarer Zellen mit sich bringt, wie auch die u. U. langwierige manuelle Postklassifikation nicht-erfasster Spines als Nachteile des Gene Gun-Verfahrens zu werten (s. u.). Des Weiteren soll darauf hingewiesen werden, dass die 3D-Spine-Analyse auf Basis des derzeit etablierten 3D-Algorithmus mit gewissen Einschränkungen verbunden ist. So wurden von der Definiens-Software oftmals zusätzliche, manuell nicht erkennbare Stubby-Spines eingefügt. Diese wurden im Zuge der manuellen Nachklassifizierung ebenfalls korrigiert bzw. entfernt, da es sich entweder um Unebenheiten auf der Dendrit-Oberfläche oder um die Verbindungsstelle zwischen v. a. Mushroom-Spines und Dendrit (verdickte Hälse) handelte. Möglicherweise kann eine Anpassung des für die automatisierte Segmentierung zugrunde gelegten Schwellwerts dieses Problem abmildern. Allerdings ist hierbei zu bedenken, dass eine Erhöhung des

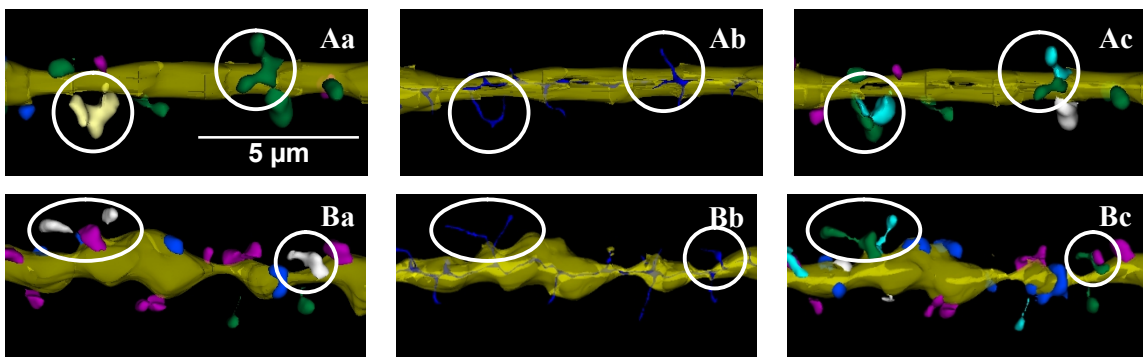
Schwellwerts zu einem Verlust von vorher detektierten Spines führen kann, indem diese zum Hintergrund segmentiert werden.

6.1.2 Ausblick auf die Optimierung der 3D-Spine-Analyse

Wie oben angesprochen, blieben in fast allen konfokalen Bildern von der Software als „undefined spines“ ausgewiesene Strukturen zurück, die einer manuellen Nachklassifikation bedurften. Vielfach handelte es sich hierbei allerdings nicht um einzelne Spines ungewöhnlicher Morphologie, welche durch eingehende dreidimensionale Betrachtung und sorgfältigen Vergleich mit den Original-Aufnahmen nachträglich identifiziert werden konnten, sondern um verschmolzene Komplexe aus zwei oder mehr Spines. Um eine Verfälschung der Spinezahlen der vier definierten Klassen (Mushroom, Thin, Stubby, Filopodia) zu vermeiden, wurden diese Gebilde als „undefined spines“ beibehalten. In der Gesamt-Spinedichte wurde ihre Anzahl jedoch berücksichtigt, obwohl auch dabei jeweils nur ein Spine anstelle von mindestens zwei Dornfortsätzen erfasst wurde. Da dieses Vorgehen aber bei allen Spine-Analysen konstant durchgeführt wurde, resultierte daraus keine generelle Fehlerhaftigkeit. Trotzdem sind bei einer automatischen Differenzierung und Einzelerkennung dieser komplexierten Spines quantitative Anstiege der Spine-Subtypen sowie der Gesamt-Spines zu erwarten. Um folglich in künftigen Studien eine noch exaktere Spine-Detektion zu gewährleisten, wird derzeit in der Arbeitsgruppe eine Weiterentwicklung der 3D-Analyse getestet. Hierbei handelt es sich um eine Erweiterung mit dem sogenannten „Skelett-Modell“ (s. Abb. 51, Ab + Bb), das erst kürzlich von Seiten des Herstellers als performanter Baustein in die Software eingebunden wurde. Mit deren Anwendung ergibt sich im Vergleich zur bisherigen 3D-Auswertung (vgl. Abb. 20) ein zusätzlicher Auswerteschritt: An die Segmentierung schließt sich nicht unmittelbar die Detektion der Spines an, sondern es wird zunächst ein Skelett vom Dendrit und den Spines modelliert, wie in Abbildung 51 in Blau (Ab, Bb) veranschaulicht. Sozusagen das Rückgrat verläuft als Mittelachse im Dendrit, die „Skelettknochen“ entspringen diesem an den Positionen, an denen potentielle Spines lokalisiert sind, und erstrecken sich ebenfalls mittig in der Struktur bis zu deren jeweiliger Spitze nach außen. Vom Rückgrat ausgehend wächst dann der Dendrit in einem vordefinierten Prozess bis zum Rand des Objektes, um einen glatten Verlauf des Dendriten zu sichern. Anschließend wachsen die übrigen „Skelettknochen“ in die einzelnen Spines hinein. Dadurch werden eine feinere Identifizierung sowie eine optimierte Differenzierung und Einzelerkennung von

zu Komplexen vereinigten Spines sichergestellt (Abb. 51, Aa + Ac, Ba + Bc). Auch wenn eine zu 100 % korrekte Software-gesteuerte Spine-Klassifikation aufgrund der hohen Diversität zwischen den Spine-Formen vermutlich nicht garantiert werden kann, wird angenommen, dass die Integration des „Skelett-Modells“ in den etablierten 3D-Algorithmus insgesamt zu deutlich weniger „undefined spines“ (vgl. Abb. 51, Bc) und Spine-Komplexen führt (vgl. Abb. 51, Ac) und somit die manuelle Nachklassifizierung beschleunigt und erleichtert. Allerdings ist dies eine noch zu verifizierende Annahme.

Abb. 51: Exemplarische Darstellung der Anwendung des „Skelett-Modells“ in der automatisierten 3D-Spine-Analyse



Die Bilder Aa und Ba zeigen nach dem derzeit etablierten 3D-Algorithmus klassifizierte Spines, deren Erscheinung in der Definiens Architect XD-Software hier zweidimensional dargestellt ist. Durch die Kreise (Aa - Ac, Ba - Bc) werden von der Software nicht klassifizierte Strukturen (beige, Aa; weiß, Ba) bzw. zusammengefasste Spines (grün, Aa) markiert. Die Fotos Ab und Bb demonstrieren den neuen Ansatz mit dem noch nicht verifizierten Skelett-Modell, wobei das Skelett, das mittig in Dendrit und Spines verläuft, in Blau dargestellt ist. Den Bildern Ac und Bc ist die Spine-Klassifikation auf Basis des Skelett-Modells zu entnehmen. Beim Vergleich der in Aa und Ac hervorgehobenen Strukturen wird deutlich, dass einerseits der vom aktuellen 3D-Algorithmus nicht erfasste Komplex (beige, Aa) nach Anwendung der Skelett-Modellierung als Mushroom- (grün, Ac) und Filopodia-Spines (hellblau, Ac) detektiert wurde. Andererseits wurde auch der aus zwei verschmolzenen Spines bestehende Mushroom-Komplex (grün, Aa) durch die Skelett-Konstruktion in zwei Spines (grün: Mushroom, hellblau: Filopodium, Ac) differenziert. Ähnliches geht aus der vergleichenden Betrachtung der in Ba und Bc gekennzeichneten Spines hervor. Während der derzeitige 3D-Algorithmus „undefined spines“ (weiß, Ba) zurücklässt, werden mit Hilfe des Skelett-Modells sowohl die einzelnen Spines (links im Bild) als auch der Spine-Komplex (rechts im Bild) als Mushroom- (grün, Bc) und Filopodia-Spines (hellblau, Bc) bzw. Mushroom- (grün, Bc) und Thin-Spines (violett, Bc) identifiziert. Olivgrün: Dendrit; beige: weder als Spine noch als Dendrit erkannte Strukturen, von der Software als „passive“ bezeichnet; dunkelblau: Stubby-Spines.

6.2 Untersuchung synaptischer Dornfortsätze im APPSWE-Modell des Morbus Alzheimer

Wie bereits eingangs erläutert, wurden im Rahmen der Etablierung der diolistischen Fluoreszenzmarkierung zur Visualisierung synaptischer Dornfortsätze sowie der automatisierten Spine-Analyse distale Segmente basaler Pyramidenzellendriten der hippocampalen CA1-Region in transgenen APPSWE-Mäusen (Tg2576) im Vergleich zu WT-Kontrollen untersucht (vgl. Ergebnisse 5.3 und 5.4). Zunächst wurden die fluoreszenzmarkierten Spines zuvor genannter Dendritenabschnitte in acht Monate alten Tieren auf manuellem Wege dreidimensional quantifiziert und klassifiziert. Die Spine-Analyse zeigte keinen Genotyp-Effekt - weder in Bezug auf die Gesamt-Spinedichte noch hinsichtlich der vier evaluierten Spine-Klassen (Mushroom, Thin, Stubby, Filopodia). Das Ausbleiben signifikanter Differenzen zwischen transgenen und WT-Mäusen lässt sich damit begründen, dass die hier verwendeten acht Monate alten transgenen Tiere altersbedingt die Pathologie des Morbus Alzheimer nur eingeschränkt abbildeten. Diesbezüglich publizierten HSIAO et al. (1996) die Beeinträchtigung von Lernverhalten und Gedächtnis in Tg2576-Mäusen, die neun Monate und älter waren. Diese Defizite gingen mit einer deutlich erhöhten A β -Menge (A β 40 und A β 42) sowie des Vorhandenseins zahlreicher A β -haltiger extrazellulärer Plaques einher (HSIAO et al., 1996). Des Weiteren ist der Literatur zu entnehmen (KAWARABAYASHI et al., 2001; WESTERMAN et al., 2002), dass im Alter zwischen sechs und zehn Monaten zwar unlösliche A β 40- und A β 42-Peptide in den transgenen Mäusen detektierbar, jedoch histopathologische Veränderungen nur minimal erkennbar sind. Erst im Alter von etwa 9-12 Monaten setzt die Ablagerung der für die Alzheimer-Krankheit typischen Amyloid-Plaques ein (KAWARABAYASHI et al., 2001; WESTERMAN et al., 2002), welche schließlich identifiziert werden können. Dennoch waren PEREZ-CRUZ et al. (2011) in der Lage, anhand Golgi-markierter Spines bereits im Alter von 5,5 Monaten eine signifikante Reduktion der Mushroom-Spines auf proximalen, nicht aber auf distalen Segmenten der basalen CA1-Pyramidenzellendriten in den APPSWE-Mäusen verglichen mit WT-Tieren nachzuweisen. Die Ursache dieser selektiven Degeneration proximaler Synapsen sahen PEREZ-CRUZ und Kollegen (2011) im Verlust GABAerger Interneuronaferenzen und der daraus folgenden lokalen glutamatergen Exzitotoxizität, denn der inhibitorische Input erreicht die CA1-Pyramidenzellen hauptsächlich in der perisomatischen Region, d. h. proximal (MEGÍAS et al., 2001).

Da mit zunehmendem Alter der Tiere (12-23 Monate) auch die Histopathologie immer drastischer hervortritt und die der humanen Erkrankung widerspiegelt (u. a. unzählige

neuritische Plaques mit A β -Kern, hohe Plasma-Konzentrationen an A β 40 und A β 42) (KAWARABAYASHI et al., 2001), wurde die Untersuchung der synaptischen Dornfortsätze auf einen Genotyp-Effekt erneut in 14 Monate alten transgenen Tieren und entsprechenden WT-Kontrollen vorgenommen. Zu diesem Zeitpunkt war der selbst entwickelte 3D-Detektions- und Klassifikationslogarithmus des Spine-Analyse-Moduls etabliert, weshalb die 3D-Spine-Evaluation dieses Mal automatisiert durchgeführt werden konnte. Analog zur Untersuchung in den acht Monate alten Tieren wurden hier ebenfalls distale Abschnitte der basalen CA1-Pyramidenzellendriten ausgewertet. Die automatisierte 3D-Spine-Analyse zeigte eine signifikante Reduktion der Mushroom-Spines in den APPSWE-Mäusen verglichen mit den Wildtypen. Im Gegensatz zu den acht Monate alten transgenen Tieren (s. o.) schienen folglich in den 14 Monate alten APPSWE-Mäusen die histopathologischen Alterationen weit genug fortgeschritten zu sein, um die Quantität der synaptischen Dornfortsätze distaler Abschnitte der basalen CA1-Dendriten selektiv zu beeinflussen. Wie aus der Literatur hervorgeht (TACKENBERG et al., 2009; PEREZ-CRUZ et al., 2011), handelt es sich bei den Mushroom-Spines um den stabilsten Subtyp, der für die Formung des Gedächtnisses verantwortlich ist (TACKENBERG et al., 2009). Der hier nachgewiesene Verlust der Mushroom-Spines steht daher sowohl mit der für das Tiermodell beobachteten Beeinträchtigung in Lernen und Gedächtnis in Einklang als auch mit der Symptomatik der humanen Erkrankung. Denkbare Ursachen für die verminderte Anzahl an Mushroom-Spines in den transgenen verglichen mit den WT-Mäusen sind Auswirkungen der Überexpression des mutierten humanen Amyloid-Vorläuferproteins, der in diesem Alter u. a. im Hippokampus (HSIAO et al., 1996) vorhandenen A β -haltigen Plaques und/oder der drastisch erhöhten A β -Konzentration (HSIAO et al., 1996; ALPÁR et al., 2006).

6.3 Funktionell-morphologische Charakterisierung von Synapsen im Vorderhirn präklinischer Maus- und Ratten-Modelle der Schizophrenie

In dieser Arbeit wurden fünf verschiedene präklinische Maus- und Rattenmodelle der Schizophrenie u. a. nach diolistischer Fluoreszenzmarkierung neuroanatomisch charakterisiert. Die Tiere der pharmakologisch-induzierten Modelle (AMPH und Quinp.) wurden zudem anhand ihrer lokomotorischen Aktivität (Hyperaktivität) nach Substanz-Behandlung beurteilt. Bezüglich der neuroanatomischen Betrachtung der Tiermodelle standen die Morphologie und Dichte der synaptischen Dornfortsätze, die dendritische Komplexität sowie die Distribution inhibitorischer Interneurone im Fokus des Interesses. Für jedes Tiermodell wurden Analyseverfahren angewandt, um mindestens zwei der drei zuvor genannten morphologischen Parameter in Gehirnarealen zu untersuchen, die mit einer Erkrankung an Schizophrenie assoziiert sind. Im Folgenden werden die zu jedem Modell gewonnenen Erkenntnisse zunächst einzeln, abschließend in Zusammenfassung diskutiert.

6.3.1 Psychostimulans-basierte Modelle der Schizophrenie

6.3.1.1 Pharmakologische Induktion Schizophrenie-typischer Symptome mittels Amphetamin-Applikation

6.3.1.1.1 Locomotorische Verhaltenssensitivierung nach subchronischer Amphetamin-Behandlung

Auf der Grundlage des hier verwendeten Versuchsdesigns der repetitiven Amphetamin-Applikation (vgl. Abb. 6) konnte zwar eine gesteigerte Reaktion gegenüber den Psychomotorik stimulierenden AMPH-Effekten (Hyperlokomotion) gezeigt werden, jedoch gelang es weder eine klare Verhaltenssensitivierung noch neuroanatomische AMPH-Effekte zu induzieren. Einerseits ist die relativ homogene Lokomotion, die an den Versuchstagen 1-5 jeweils zwischen den beiden mit NaCl bzw. mit AMPH behandelten Tiergruppen im OF-Test vorlag, als positiv zu werten (vgl. Ergebnisse, Abschnitt 5.5.1.1.1). Denn aufgrund der identischen Behandlung der jeweiligen Ratten zweier Gruppen an den ersten fünf Tagen des Experiments wurde auch ein einheitliches Lokomotionsverhalten dieser Tiere erwartet. Andererseits wurde in Anlehnung an frühere Studien (z. B. Li et al., 2003; SINGER et al., 2009) allerdings davon ausgegangen, dass die wiederholte AMPH-Gabe eine lokomotorische Verhaltenssensitivierung in den Ratten auslöst, d. h. dass als Antwort auf eine akute Substanz-Exposition in gleicher oder geringerer Dosierung diese

lokomotorische Hyperaktivität noch Wochen bis Monate nach Beendigung der Behandlung nachweisbar bleiben sollte (ROBINSON et al., 1998; SINGER et al., 2009). Die Sensitivierung ließ sich jedoch mit Hilfe des Challenge-Tests im OF nicht bestätigen, weshalb davon auszugehen ist, dass auch die Entwicklung der Sensitivierung im Verlauf der täglichen Substanzinjektionen nicht oder zumindest nur eingeschränkt stattfand. Dies war daran zu erkennen, dass zum einen die schrittweise Steigerung der lokomotorischen Hyperaktivität der AMPH-Tiere von Versuchstag zu Versuchstag ausblieb und zum anderen die akute AMPH-Gabe einen im Vergleich zur subchronischen Verabreichung noch stärkeren Effekt auf die horizontale Aktivität der Tiere ausübte. Obwohl die Lokomotion der subchronisch mit AMPH vorbehandelten Tiere an Tag 12 gegenüber Tag 1 signifikant erhöht war (Daten nicht gezeigt), überschritt diese Hyperaktivität nicht den akuten Substanz-Effekt. Ebenfalls unerwartet zeigten die reinen NaCl-Tiere an Tag 12 vs. Tag 1 auch eine signifikant gesteigerte lokomotorische Aktivität im OF-Test (Daten nicht gezeigt). Das heißt, die Ratten reagierten im Challenge-Test eine Woche nach der letzten Injektion der Vorbehandlung (hier: NaCl) an sich, also ohne Applikation des Psychostimulans, aktiver als während des ersten Tests im OF. Diese erhöhte Lokomotion kann einerseits auf ein gesteigertes Explorationsverhalten in Form horizontaler Aktivität, andererseits auf ein gestresstes Verhalten der Tiere hindeuten. Eine plausible Erklärung für diese Auffälligkeit der Vehikeltiere liegt allerdings nicht vor.

Darüber hinaus war der als konditionierte Lokomotion bezeichnete Effekt der konsekutiven Vorbehandlung mit AMPH zwar erkennbar, fiel jedoch statistisch nicht-signifikant aus. Obwohl eine der beiden subchronischen AMPH-Gruppen (AMPH-NaCl) am letzten Versuchstag anstelle von AMPH mit Vehikel behandelt wurde, zeigten diese Tiere gegenüber den Kontrollen weiterhin eine etwa 1,5-fach höhere, allerdings nicht länger signifikant differierende Lokomotion. Daraus ist nur eine ansatzweise Assoziation zwischen dem Stimulus der Injektion und der spezifischen Testumgebung im OF ersichtlich. Das bedeutet, die Reaktion der Tiere in Form einer erhöhten horizontalen Aktivität trat primär in Verbindung mit dem auslösenden Stimulus, d. h. der Applikation von AMPH, auf. Wurde der auslösende Reiz durch einen anderen, nämlich die Verabreichung von Vehikel, ersetzt, stellte sich nur eine mäßig erhöhte Lokomotion ein, welche eine geringe Verhaltenskonditionierung als Antwort auf die Paarung der Injektion mit der spezifischen Testumgebung (SINGER et al., 2009) belegt. Im Nachhinein betrachtet wäre es durchaus hilfreich gewesen, mindestens einen weiteren Verhaltenstest, z. B. auf Präpulsinhibition oder latente Inhibition (PELEG-RAIBSTEIN et al., 2008), in das

Versuchsdesign zu integrieren, um die AMPH-Effekte auf das Verhalten umfassender beurteilen zu können. Entweder hätten weiterführende Verhaltenstests die o. g. geringen Substanzeffekte verifizieren und bekräftigen oder deutlichere Auswirkungen der subchronischen AMPH-Behandlung zeigen können.

6.3.1.1.2 Untersuchung synaptischer Dornfortsätze im Amphetamin-Modell

Insgesamt betrachtet ließen sich die verhaltenspharmakologischen Ergebnisse mit denen der histologischen und morphologischen Analysen vereinbaren. Aufgrund der nicht vorhandenen Verhaltenssensitivierung erscheint das weitgehende Ausbleiben von AMPH-Effekten auf die Dichte und Morphologie der synaptischen Dornfortsätze (vgl. Ergebnisse, Abb. 30) sowie die Quantität inhibitorischer PV⁺ Interneurone (s. Abb. 29) folgerichtig. Auch wenn die Tiere, wie zuvor beschrieben, neue Stimulus-Umgebungs-Assoziationen ausbildeten, kam es weder zur korrekten Initiierung noch zur Expression der Sensitivierung. Daraus muss gefolgert werden, dass die AMPH-induzierte Steigerung der mesolimbischen DA-Transmission (STAHL, 2013) nur partiell erreicht wurde. Die nur eingeschränkte Erhöhung der synaptischen Aktivität war möglicherweise nicht ausreichend, um Veränderungen in der synaptischen Dichte bzw. der Spines, speziell im VTA (Initiierung) sowie NAcc und Striatum (Expression), hervorzurufen. Der jedoch für die Schalenregion des NAcc nachgewiesene signifikante Rückgang der Filopodia-Spines nach subchronischer verglichen mit akuter AMPH-Behandlung stand im Gegensatz zu den Erwartungen. Unter Berücksichtigung des Lebenszyklus der Spines (vgl. Abschnitt 2.4) wurde stattdessen angenommen, dass aufgrund der Ausbildung neuer Stimulus-Umgebungs-Assoziationen bzw. während der Konditionierung der lokomotorischen Reaktion neue Vorläufer-Spines (Filopodia) aussprossen, welche sich letztlich in reife Spines umwandeln (SORRA & HARRIS, 2000; POLLEUX & GHOSH, 2008). In der Literatur wird zwar über Zunahmen der Spine-Dichte im NAcc nach subchronischer AMPH-Applikation berichtet (ROBINSON & KOLB 1997 + 1999; LI et al., 2003; SINGER et al., 2009), aber aus den Daten ist nicht ersichtlich, ob bei diesen Analysen auch Filopodia-Spines berücksichtigt wurden. Da die Filopodia eine Sonderstellung einnehmen, ist es durchaus denkbar, dass sich diese vorhergehenden Untersuchungen vornehmlich auf die reifen, mit Hilfe der Golgi-Färbung erkennbaren Mushroom-Spines beschränkten. In diesem Zusammenhang soll auch auf die verschiedenen Analysemethoden hingewiesen werden. Während in den o. g. früheren Studien die lichtmikroskopische Spine-Zählung Golgi-gefärbter Dendriten

genutzt wurde, wurde hier mit der konfokalen Bildanalyse nach diolistischer Fluoreszenzmarkierung gearbeitet. Darüber hinaus bestehen zwischen der hier durchgeführten Studie und den zuvor genannten Experimenten neben der teilweisen Verwendung beider Geschlechter der Versuchstiere wesentliche Diskrepanzen in der Dosierung und Applikationsdauer von AMPH. Diese zuvor publizierten Ergebnisse (ROBINSON & KOLB 1997 + 1999; LI et al., 2003; SINGER et al., 2009) beruhen auf höheren und ansteigenden Substanzdosen, die über einen längeren Zeitraum intermittierend verabreicht wurden und folglich schwerwiegendere Alterationen in Verhalten, synaptischer Transmission und Spinedichte auslösten.

6.3.1.1.3 Quantifizierung kortikaler und hippocampaler PV⁺ Interneurone im Amphetamin-Modell

Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass in der vorliegenden Dissertation auch hinsichtlich der PV⁺ Interneuronpopulationen diverser Gehirnnareale keine AMPH-Effekte ermittelt werden konnten (vgl. Ergebnisse, Abb. 29). Auch wenn MORSHEDI & MEREDITH (2007) nach konstant-konsekutiver subchronischer AMPH-Gabe eine signifikante Abnahme der PV⁺ Interneuronpopulation im PrL belegten, soll auf den gegenüber des hier zugrundeliegenden Protokolls langen 3-wöchigen Applikationsrhythmus hingewiesen werden. Zudem verwendeten MORSHEDI & MEREDITH (2007) die dreifache AMPH-Konzentration. Um die aus humanen *post mortem*-Studien hervorgehenden Defizite inhibitorischer GABAerger Interneurone (u. a. LEWIS et al., 1999; ZHANG & REYNOLDS, 2002), insbesondere PV-exprimierender, tierexperimentell nachzuahmen, scheint folglich wenigstens die Erhöhung AMPH-Dosis und/oder Applikationsdauer erforderlich zu sein.

Als Fazit lässt sich aus den hier durchgeführten Analysen folgern, dass die konsekutive Behandlung mit AMPH an fünf aufeinander folgenden Tagen in einer Dosierung von 1 mg/kg die DA-Transmission nur eingeschränkt erhöhte. In Einklang damit ist eine verminderte GABAerge Inhibition von z. B. Pyramidenzellen zumindest für den PV-exprimierenden Interneuronotyp auszuschließen, da in keiner der evaluierten Hirnregionen diesbezüglich Unterschiede erkennbar waren. Auf der Basis dieser neurochemischen Gegebenheiten blieben folgerichtig auch lokomotorische Substanz-Effekte, wie die Verhaltenssensitivierung, und Veränderungen der Spine-Dichte aus.

6.3.1.1.4 Methodische Beurteilung des Amphetamin-Modells

Ganz generell sind der Literatur in Bezug auf das experimentelle Design der lokomotorischen Verhaltenssensitivierung mittels AMPH-Applikation vielfache Unterschiede zu entnehmen. Neben der wie hier eingesetzten Substanzinjektion in konstanter Dosis, die jedoch in der Regel höher ist, wird häufig die oben erwähnte intermittierende und/oder ansteigende Dosierung eingesetzt, welche zumindest final ebenfalls deutlich über der hier eingesetzten liegt. Auch was Applikationsrhythmus und -dauer anbelangt, reichen die Versuchsprotokolle von einmal täglich - wie hier - für z. B. fünf oder sechs konsekutive Tage (GRUEN et al., 1999) über drei Mal täglich für 18 Tage (PELEG-RAIBSTEIN et al., 2008) bis hin zu jeden 3. Tag für fünf insgesamt Applikationen (SINGER et al., 2009). Ebenso existieren für das applikationsfreie Zeitintervall, das zwischen der letzten Injektion und dem Challenge-Test liegt, keine einheitlichen Angaben, beispielsweise 2-3 Wochen (SINGER et al., 2009). Diese hohe Variabilität der Versuchsdurchführung zeigt, dass es sich bei dem AMPH-Modell zwar um ein vielfach genutztes präklinisches Tiermodell der Schizophrenie handelt, es aber - ähnlich wie beim OF-Test - kein standardisiertes Vorgehen gibt. Dementsprechend ist ein direkter Ergebnisvergleich schwierig und muss stets die differierenden Parameter berücksichtigen. Wie zuvor erwähnt, richtet sich auch der Verhaltenstest im OF nicht an einem allgemein gültigen Protokoll aus, sondern vielmehr an den laborinternen Erfahrungen und Gegebenheiten. Somit trafen bei der hier durchgeführten AMPH-Studie zwei variable Einflussgrößen aufeinander, die den Datenvergleich mit zuvor gewonnenen Erkenntnissen erschwerten. Nichtsdestotrotz ist es möglich, auf Basis einer konstanten und täglichen Applikation von AMPH eine lokomotorische Sensitivierung herbeizuführen (GRUEN et al., 1999; HÉDOU et al., 2002). Deshalb muss in Betracht gezogen werden, dass das in der vorliegenden Arbeit zugrunde gelegte Versuchsdesign, insbesondere die Kombination aus konsekutiver Applikation und vergleichsweise geringer AMPH-Dosierung (1 mg/kg), nicht robust genug ist, um zuverlässig reproduzierbar Schizophrenie-typische Symptome pharmakologisch zu induzieren.

6.3.1.2 Pharmakologische Induktion Schizophrenie-typischer Symptome mittels Quinpirol-Applikation

6.3.1.2.1 Lokomotorische Verhaltenssensitivierung nach subchronischer Quinpirol-Behandlung

In Folge einer subchronischen Quinp.-Behandlung mit gleichbleibender, intermittierend verabreichter Dosis (0,25 mg/kg; s. auch Abb. 7) wurde die bereits zuvor für das Modell beschriebene Verhaltenssensitivierung (SULLIVAN et al., 1998; DVORKIN et al., 2008), d. h. die erhöhte Reaktion der Tiere auf die Psychomotorik aktivierenden Quinp.-Effekte, erfolgreich reproduziert. Sowohl die für die Entwicklungsphase der Sensitivierung erwartete schrittweise Zunahme der horizontalen Aktivität der Versuchstiere (LOMANOWSKA et al., 2004), als auch ein gegenüber der subchronischen Wirkung signifikant geringerer akuter Quinp.-Effekt auf die Lokomotion waren nachweisbar (SCHUETZ et al., 2004 + 2005). Die mit Quinp. vorbehandelten Tiere zeigten an Tag 15 gegenüber Tag 1 eine hochsignifikant erhöhte Lokomotion nach der erneuten Substanzgabe (Daten nicht gezeigt) und legten damit am letzten Tag eine hochsignifikant größere Strecke im OF zurück als die akut mit Quinp. applizierten Ratten. Die Gesamtlaufstrecke aller Tiere, die einheitlich mit Vehikel vorbehandelt wurden, ist während der ersten fünf OF-Tests fast identisch. Das deutet darauf hin, dass die Tiere im Verlauf des Versuchs weder eine gesteigerte noch eine verminderte Exploration gegenüber der OF-Umgebung in Form horizontaler Aktivität zeigten. Jedoch lässt die hier durchgeführte Auswertung keine Aussage zur räumlichen Verteilung der horizontalen Aktivität zu. Die in den Randregionen und im zentralen Bereich der Testarena zurückgelegten Laufstrecken wurden nicht differenziert betrachtet. Eine vertiefende Analyse des generellen sowie des Substanzbedingten Verhaltens unter Einbeziehung z. B. der vertikalen Aktivität (Aufrichten) und des Putzverhaltens der Tiere wäre besonders für den Quinp.-, aber auch den AMPH-Versuch denkbar und mit Hilfe des OF-Tests möglich. Damit könnten auch stereotype Verhaltensweisen nach subchronischer Quinp.-Behandlung (DVORKIN et al., 2008) überprüft und die Gesamtaktivität der Tiere eingehender beurteilt werden.

6.3.1.2.2 Untersuchung synaptischer Dornfortsätze im Quinpirol-Modell

In Hinblick auf morphologisch-synaptische Substanzeffekte fanden DVORKIN et al. (2008) nach subchronischer Quinp.-Behandlung gegensätzliche Effekte auf die Spinedichte der Pyramidenneurone unterschiedlicher Kortex-Areale, nämlich eine Abnahme in Cg3 sowie

eine Zunahme im primären somatosensorischen Kortex. Die hier detektierte tendenzielle Zunahme der Anzahl an Thin-Spines/ μm Dendrit im prälimbischen und infralimbischen Bereich des präfrontalen Kortex (vgl. Abb. 35, Ergebnisse) unterstreicht Region-spezifische Auswirkungen der Quinp.-Gabe auf die synaptischen Dornfortsätze. Bei den Thin-Spines handelt es sich im Vergleich zu den Mushrooms vermutlich um flexiblere, für Lernvorgänge essentielle Strukturen (TACKENBERG et al., 2009), deren quantitativer Anstieg im mPFC einerseits auf eine erfahrungsabhängige morphologische Plastizität schließen lässt, welche durch eine Quinp.-induzierte Beeinflussung des synaptischen Inputs hervorgerufen wurde. Andererseits kann sich die Quinp.-vermittelte Hyperstimulation postsynaptischer DA-D₂- und D₃-Rezeptoren auch auf zwischengeschaltete GABAerge Interneurone beziehen, weshalb ein Anstieg der Spine-Dichte auf den Dendriten der Zielneurone (Pyramidenzellen) dann als kompensatorische Reaktion auf eine verminderte synaptische Transmission gedeutet werden kann (DVORKIN et al., 2008). Vor allem die Quinp.-bedingten Spineveränderungen im NAcc spiegeln (s. Abb. 35) eine subtile Beeinflussung der synaptischen Aktivität in einem Bereich wider, der die axonalen Endigungen dopaminerger mesolimbischer Neurone enthält. Die von GEHLERT et al. (1992) für Quinp. belegte hohe Bindungsdichte u. a. im NAcc reflektiert die über die Stimulation postsynaptischer DA-D₂- und D₃-Rezeptoren vermittelte wesentliche Beteiligung dieser Hirnstruktur an der Expression der Quinp.-induzierten Verhaltenssensitivierung (KOELTZOW et al., 2003). Demnach ist es durchaus denkbar, dass die durch den Anstieg der Filopodia-Spines getriebene Zunahme der Gesamt-Spinedichte in der Kernregion des NAcc mit den Verhaltensänderungen verbunden ist. Weil es sich jedoch bei den Filopodia-Spines um den dynamischsten der vier hier untersuchten Subtypen mit der kürzesten Lebensdauer handelt (SORRA & HARRIS, 2000), weist dessen quantitative Abweichung nach Quinp.-Behandlung gegenüber Kontrollen einen transienten Zustand nach. Vorstellbar ist, dass die der Expression der Sensitivierung zugrundeliegenden persistierenden neuronalen Veränderungen (PIERCE & KALIVAS, 1997) sozusagen sekundär vorübergehende morphologische Reaktionen in Form der Filopodia-Spines hervorriefen. Ein unmittelbarer Akuteffekt der Challenge-Injektion als Ursache der accumbalen Spine-Veränderungen ist nicht anzunehmen, da Perfusion und Gehirn-Fixierung vier Tage (bei AMPH drei) nach dem Challenge-Test erfolgten. Um mögliche akute Substanz-Effekte einbeziehen und direkt mit subchronischen Auswirkungen vergleichen zu können, erscheint es für die Zukunft empfehlenswert, die Gehirne sofort nach Abschluss des Challenge-Test zu präparieren (SULLIVAN et al., 1998).

6.3.1.2.3 Untersuchung synaptischer Dornfortsätze - vergleichende Betrachtung der zwei pharmakologisch-induzierten Rattenmodelle der Schizophrenie

Insgesamt betrachtet konnten mit Hilfe der diolistischen Fluoreszenzmarkierung und dreidimensionalen Spine-Analyse in beiden hier evaluierten pharmakologischen Tiermodelle der Schizophrenie (Quinp. und AMPH) wenig verbreitete morphologische Unterschiede der synaptischen Dornfortsätze nachgewiesen werden. Da Psychostimulanzien wie Quinp. und AMPH ihre Wirkung über das mesolimbische DA-System ausüben (STAHL, 2013), erscheint es schlüssig, dass zumindest ein Teil der ermittelten Spine-Alterationen innerhalb dieses Systems vorlag. Die Auswirkungen einer subchronischen Behandlung mit Quinp. bzw. AMPH auf die Quantität und Morphologie synaptischer Dornfortsätze betrafen u. a. in beiden Fällen den NAcc in gegensätzlicher Weise (AMPH/Quinp.: reduzierte/erhöhte Quantität der Filopodia). Das deutet darauf hin, dass die zwei Psychostimulanzien, obwohl sie beide die mesolimbische DA-Transmission anregen, die synaptische Organisation different beeinflussen. Möglicherweise bedingen die Unterschiede im Wirkmechanismus des indirekten (AMPH) bzw. direkten DA-Agonisten (Quinp.) diese spezifischen Effekte. Hinsichtlich der Ergebnisbeurteilung einzelner Spine-Klassen muss jedoch beachtet werden, dass anhand der AMPH-Studie die zuvor für ein präklinisches Mausmodell (APPSWE) etablierte automatisierte Spine-Analyse erstmalig auf ein Rattenmodell angewandt wurde. Zu diesem Zeitpunkt in der Entwicklung der automatisierten 3D-Spine-Analyse lagen noch keine Hirnregion-spezifischen Adaptationen der Klassifikationsparameter vor. Diese waren erst ab der folgenden Spine-Auswertung im Quinp.-Modell in das Analyse-Modul integriert und gewährleisteten eine noch präzisere morphologische Differenzierung der Spines in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation. Für das AMPH-Modell wurden stattdessen die als erstes für die CA1-Region im Mausmodell etablierten Zugehörigkeitskriterien der vier Spine-Klassen, jeweils definiert über Spine-Länge und Kopfdurchmesser, für alle ausgewerteten Gehirnareale einheitlich verwendet. Diese Studien-abhängigen Abweichungen in der 3D-Spine-Klassifikation erschweren eine vergleichende Gesamtbeurteilung der beiden pharmakologischen Tiermodelle der Schizophrenie hinsichtlich der jeweiligen Substanz-Effekte auf die Spine-Morphologie. Im Gegensatz dazu konnten die Resultate der 3D-Spine-Analyse zwischen Quinp.- und Poly I:C-Studie aufgrund der identischen Hirnregion-spezifischen Spine-Klassifikationswerte zweifelsfrei miteinander verglichen werden, wie in Abschnitt 6.3.2.2.4 beschrieben. Dadurch ließ sich ein pharmakologisches einem neuroentwicklungsbiologischen präklinischen Tiermodell der

Schizophrenie hinsichtlich Substanz-induzierter subtiler morphologischer Alterationen in Form von Spine-Veränderungen gegenüberstellen.

6.3.1.2.4 Quantifizierung kortikaler und hippocampaler PV⁺ Interneurone im Quinpirol-Modell

Analog zum präklinischen AMPH-Modell der Schizophrenie ließ sich auch nach subchronischer Quinp.-Behandlung die Hypothese einer Substanz-induzierten Reduktion PV⁺ Interneuronpopulationen im (prä-) frontalen Kortex und Hippokampus nicht bestätigen (s. Ergebnisse, Abb. 34). Demnach scheint die Verhaltenssensitivierung nach subchronischer Quinp.-Gabe auf neuroanatomischer Ebene nicht mit Veränderungen der PV⁺ Interneurone verknüpft zu sein. Eine generelle oder anderswo stattfindende Beeinflussung des GABAergen Transmittersystems, z. B. im VTA, in dem die Initiierung der lokomotorischen Sensitivierung abläuft (KALIVAS & STEWART 1991; PIERCE & KALIVAS, 1997), kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Da Quinp. aufgrund der dortigen hohen Rezeptordichte u. a. stark im Striatum und NAcc bindet (GEHLERT et al., 1992), sind auch in diesen Hirnregionen Substanz-bedingte Modifikationen des GABAergen Systems vorstellbar. Da jedoch weder mittels konstant-intermittierender Quinp.- noch durch konstant-konsequente AMPH-Behandlung Substanzeffekte auf die PV⁺ Interneurone diverser - beim Menschen mit einer Erkrankung an Schizophrenie assoziierter - Hirnregionen verifiziert werden konnten, erscheint es im Gegensatz zu dem vorhergehenden Erklärungsansatz ferner plausibel, dass auf Basis eines pharmakologischen präklinischen Tiermodells diese speziellen Schizophrenie-typischen Alterationen nicht robust bzw. nur stark Protokoll-abhängig generiert werden können.

6.3.2 Neuroentwicklungsbiologische Modelle der Schizophrenie

6.3.2.1 Neurotoxische Induktion Schizophrenie-typischer Symptome mittels Methylazoxymethanolacetat-Exposition *in utero*

6.3.2.1.1 Ektopische Zellcluster im Hippokampus nach MAM-Exposition *in utero*

Unter Verwendung des MAM-Modells war es möglich, die im Zusammenhang mit der multifaktoriellen Ätiopathogenese der Schizophrenie ausschlaggebenden pränatalen Entwicklungsstörungen des Gehirns als ersten, die Vulnerabilität des Gehirns induzierenden Insult (MAYNARD et al., 2001) tierexperimentell zu simulieren. Auch wenn dieses Phänomen im Rahmen der vorliegenden Dissertation nicht näher beleuchtet wurde, soll darauf hingewiesen werden, dass in Übereinstimmung mit der Literatur (z. B. SINGH, 1977 + 1980; ASHWELL & WEBSTER, 1986; CHEVASSUS-AU-LOUIS et al., 1998) in den Koronarschnitten zytoarchitektonische Störungen der hippokampalen Regionen CA1 und CA2 in Form ektopischer Neurone beobachtet wurden. Die Perikarya dieser Nervenzellen waren in den Strata radiatum und oriens, vereinzelt auch im Corpus callosum lokalisiert und gingen teilweise mit Lücken im Stratum pyramidale einher (BARABAN et al., 2000). Wie schon von BARABAN et al. (2000) festgestellt, war die Größe dieser ektopischen Zellcluster stark variabel. Auf der einen Seite zeigte die Dil-Markierung in den hier detektierten Ektopien Zellen, welche die für Pyramidenneurone typische Morphologie aufwiesen. Auf der anderen Seite traten auch auf Basis der anti-Parvalbumin-Färbung Fasern und vereinzelt Perikarya in Erscheinung, weshalb davon auszugehen ist, dass zumindest ein geringer Anteil der ektopischen Zellen GABAerge Interneurone bzw. Fragmente dieser waren. Dementsprechend schienen sich die ektopischen Zellcluster aus pyramidalen und nicht-pyramidalen Nervenzellen zusammenzusetzen, was ebenfalls von CHEVASSUS-AU-LOUIS et al. (1998) publiziert wurde. Auch BARABAN und Kollegen (2000) wiesen neben Pyramiden- und Gliazellen anhand der GAD67-Färbung einige GABAerge Interneurone innerhalb der ektopischen Zellcluster im Hippokampus nach. Um die Quantität der verschiedenen Neurone einschätzen, das Vorhandensein weiterer Zelltypen überprüfen und somit die Ektopien final beurteilen zu können, wäre es jedoch erforderlich gewesen, immunhistochemische Analysen durchzuführen. Bei der vorliegenden Arbeit lag der Fokus allerdings auf der Untersuchung der dendritischen Komplexität sowie der Quantifizierung PV⁺ Interneurone.

6.3.2.1.2 Untersuchung der dendritischen Komplexität hippocampaler Pyramidenneurone im MAM-Modell

Zwar werden in der Literatur häufig sowohl die ektopischen Zellcluster (SINGH, 1980; ASHWELL & WEBSTER, 1986) einschließlich ihrer Morphologie und Neurochemie als auch die Volumen- und Größenreduktion u. a. des Hippokampus besprochen, jedoch wird auf die Morphologie der eutopen hippocampalen Pyramidenzellen kaum eingegangen. Gemäß eigener Literaturrecherche werden lediglich von SINGH (1980) bzw. MATRICON et al. (2010) MAM-induzierte Reduktionen der dendritischen Komplexität sowie Spinedichte für die korrekt lokalisierten Pyramidenzellen bzw. des Neuropils der pyramidalen CA3-Neurone erwähnt. Demzufolge scheint die in dieser Arbeit für das MAM-Modell durchgeführte Sholl-Analyse der hippocampalen Pyramidenzellen der Regionen CA1, 2 und 3 die erste detaillierte Untersuchung dieser Art zu sein (vgl. Ergebnisse, Abschnitt 5.5.2.1). Die Pyramidenzellen der CA1-Region betreffend ergaben sich daraus für die MAM-Ratten gegenüber den Kontrollen signifikant weniger primäre Dendriten pro Neuron. Die verbleibenden Dendriten zeigten jedoch weder in ihrer durchschnittlichen Länge noch in der Anzahl ihrer Schnittpunkte mit den virtuellen Sholl-Kreisen Unterschiede zu den Dendriten der Kontrolltiere. Die Anzahl dieser Schnittpunkte, welche auf die Anzahl dendritischer Äste und somit die Komplexität hinweist, war unabhängig von der Entfernung zum Zellsoma für die CA1-Neurone beider Versuchsgruppen nahezu identisch. Da auch die drei weiteren untersuchten Parameter der Sholl-Analyse - dendritische Endpunkte, Äste, Gesamtlänge jeweils pro Neuron - keine signifikanten Abweichungen zwischen MAM- und NaCl-Tieren erbrachten, ist einerseits davon auszugehen, dass das Neurotoxin keine wesentlichen Alterationen der zellulären Gesamtmorphologie verursachte. Andererseits fanden offensichtlich auch keine Kompensationsmechanismen, wie z. B. eine vermehrte Verzweigung der verbleibenden Dendriten, statt, um den Verlust der primären Dendriten auszugleichen. Zwar waren für die CA1-Neurone der MAM-Tiere geringfügig weniger dendritische Endpunkte und Äste je Neuron erkennbar, aber dies waren keine signifikanten Diskrepanzen. Daher ist es möglich, dass es sich bei den fehlenden Primärdendriten um nur kurze, wenig verzweigte Zellausläufer handelte, die einen geringen Beitrag zum zellulären Gesamterscheinungsbild leisteten. Hinsichtlich der synaptischen Funktionalität wurden aus den vorherigen Ausführungen keine MAM-induzierten Defizite exzitatorischer Synapsen geschlossen. Diese Synapsen sind auf den Köpfen der dendritischen Spines lokalisiert, die Spines sind jedoch nicht im perisomalen und proximalen, sondern vielmehr im distalen Bereich der CA1-Dendriten angesiedelt

(MEGÍAS et al., 2001). Im Gegensatz dazu befinden sich die inhibitorischen Synapsen auf den Perikarya und den spinelosen proximalen Dendritenabschnitten (MEGÍAS et al., 2001). In diesem Zusammenhang wäre es durchaus interessant gewesen, mit Hilfe der immunhistochemischen Färbung spezifischer prä- und/oder postsynaptischer Proteine (präsynaptisch z. B. Synaptophysin) die Anzahl der somalen und v. a. proximalen Synapsen der CA1-Pyramidenzellendriten der MAM-Tiere mit denen der Kontrolltiere zu vergleichen und auf Verluste zu überprüfen.

Für die Dendriten der in CA2 lokalisierten Pyramidenzellen wurden keine MAM-induzierten Veränderungen festgestellt. Für die mittlere Dendritendistanz zum Soma in CA2 gingen aus der statistischen Analyse die höchsten SEM hervor, was bei der hier analysierten kleinen Tiergruppengröße von jeweils $N = 5$ für eine hohe Variabilität der Werte innerhalb der Gruppe selbst spricht. Somit konnten anhand der hier durchgeführten Untersuchungen keine neurotoxischen Auswirkungen der pränatalen MAM-Exposition auf die dendritische Komplexität der CA2-Pyramidenzellen nachgewiesen werden.

Die in der hippokampalen CA3-Region der MAM-Tiere im Vergleich zu den Kontrollen tendenziell verringerten Dendritenäste und dendritischen Endigungen pro Neuron lassen sich mit der Beobachtung, dass die CA3-Dendriten MAM-exponierter Ratten in der proximalen Hälfte ihrer Gesamtlänge geringfügig weniger Schnittpunkte mit den Sholl-Kreisen zeigten, vereinbaren. Sowohl diese Feststellungen als auch der oben für die CA1-Region beschriebene MAM-Effekt deuten auf lokal begrenzte Auswirkungen der *in utero* Exposition mit dem Neurotoxin hin, welche sich auf den proximalen Dendritenbereich hippokampaler Pyramidenneurone beziehen. Wegen der sehr geringen Tiergruppengröße von $N = 3$ für die CA3-Region und der teilweise hohen interindividuellen Varianz innerhalb jeder Gruppe sowie aufgrund des Fehlens signifikanter Differenzen handelt es sich hierbei jedoch um eine noch zu verifizierende Hypothese. Ferner kann für beide Versuchsgruppen nicht ausgeschlossen werden, dass Pyramidenneurone unterschiedlicher Abschnitte der CA3-Region für die Analyse herangezogen wurden. Die morphologischen Unterschiede zwischen den different lokalisierten CA3-Pyramidenneuronen (ISHIZUKA et al., 1995) können einerseits ein Grund für die hohe interindividuelle Varianz sein und unterstreichen andererseits den hypothetischen Charakter der vorherigen Schlussfolgerung.

Bei der Gesamtbetrachtung aller drei Abschnitte des Ammonshorns fiel auf, dass sich die Pyramidenzellen in CA1 und CA2 bezüglich ihrer Morphologie stark ähnelten und diese auch zwischen den beiden Versuchsgruppen keine erheblichen Abweichungen zeigte. Die CA3-Pyramidenneurone hingegen zeichneten sich für beide Tiergruppen durch die

geringste Dendritenanzahl pro Neuron bei gleichzeitig höchster dendritischer Gesamtlänge aus. Für die Kontrolltiere lässt sich diese hohe Dendritenlänge mit der ebenfalls in CA3 nachweislichen höchsten Anzahl dendritischer Äste, d. h. mit den meisten dendritischen Verzweigungen, begründen. Im Gegensatz dazu gingen für die MAM-exponierten Ratten mit der in CA3 festgestellten höchsten dendritischen Gesamtlänge die wenigsten Dendritenäste einher. Demzufolge nahmen diese wenigen vorhandenen Primärdendriten und höherrangigen Verzweigungen eine Gesamtlänge ein, die größer war als die jeweilige Gesamtlänge in CA1 und CA2, was auf relativ lange CA3-Dendriten der MAM-Tiere verweist. Zusammenfassend ausgedrückt zeigten die Daten der Sholl-Analyse zwar ansatzweise MAM-induzierte Defizite bezüglich der dendritischen Komplexität hippocampaler CA1- und CA3-Neurone, was mit den Befunden der wenigen früheren Studien übereinstimmt (SINGH, 1980; MATRICON et al., 2010). Für eine finale Aussage ist allerdings eine Reproduktion der Daten erforderlich. Dabei ist die Erhöhung der Anzahl evaluierter Neurone pro Tier und Region anzustreben, um umfassendere Erkenntnisse zu gewinnen sowie die hohe Variabilität innerhalb der Versuchsgruppe zu reduzieren. Zudem erscheint es sinnvoll, die Lokalisation der CA3-Zellen zukünftig zu dokumentieren und in der statistischen Auswertung zu berücksichtigen, um dadurch Unterschiede physiologisch-morphologischer Natur innerhalb einer Gruppe auszuschließen.

6.3.2.1.3 Quantifizierung kortikaler und hippocampaler PV⁺ Interneurone im MAM-Modell

Neben den Pyramidenzellen wurden auch spezifische GABAerge Interneuronpopulationen sowohl im Hippokampus als auch in kortikalen Arealen MAM-exponierter Ratten im Vergleich zu Kontrollen untersucht (s. Abb. 37). Die Ermittlung des prozentualen Anteils PV⁺ Interneurone an der jeweiligen Gesamtfläche des ausgewerteten Hirnbereichs wurde in Anlehnung an vorhergehende Studien durchgeführt. Auf der einen Seite belegen *post mortem*-Analysen von Schizophrenie-Patienten Defizite der PV⁺ Interneurone für den präfrontalen Kortex, v. a. den dorsolateralen Abschnitt, und den Hippokampus (LEWIS et al., 1999; ZHANG & REYNOLDS, 2002). Diese Schizophrenie-typischen Alterationen lassen sich auf der anderen Seite im MAM-Modell mit Hilfe der pränatalen Neurotoxin-Exposition tierexperimentell induzieren (PENSCHUCK et al., 2006; LODGE et al., 2009; GASTAMBIDE et al., 2012). Die in der vorliegenden Dissertation durchgeführte Quantifizierung kortikaler und hippocampaler PV⁺ Interneurone erbrachte jedoch aufgrund des Ausbleibens

signifikanter Differenzen zwischen MAM- und NaCl-Tieren keine Bestätigung der früheren Erkenntnisse. Es ist allerdings darauf hinzuweisen, dass auch PENSCHUCK et al. (2006) nur für den Hippokampus, nicht aber für den präfrontalen Kortex ein MAM-induziertes Defizit PV⁺ Interneurone feststellen konnten. In Hinblick auf die exakte jeweils evaluierte Subregion des Hippokampus variieren die veröffentlichten Daten. Während LODGE et al. (2009) im ventralen Bereich des Hippokampus eine Reduktion der PV⁺ Interneurone detektierten, fanden PENSCHUCK et al. (2006) dieses Ergebnis im dorsalen Hippokampus, der auch hier ausgewertet wurde. Auch wenn die bisher publizierten immunhistochemischen Daten auf der Verwendung von Swant-Antikörpern in unterschiedlichen Konzentrationen basieren (PENSCHUCK et al., 2006; LODGE et al., 2009; GASTAMBIDE et al., 2012), ist für die vorliegende Arbeit eine unzureichende immunhistochemische Markierung der gewünschten Zellen, die eine Identifizierung möglicher Effekte erschwert hätte, auszuschließen. Das zugrunde gelegte Protokoll unter Einsatz des monoklonalen anti-Parvalbumin-Antikörpers MAB1572 von Millipore stellt eine etablierte Standardfärbung der Arbeitsgruppe dar. Des Weiteren kommen auch das Alter der Versuchstiere sowie die MAM-Dosierung als variable Einflussfaktoren weitgehend nicht in Frage, da diese Parameter vergleichbar waren. Einen weiterführenden Ansatz künftiger Analysen GABAerger Interneurone im MAM-Modell der Schizophrenie bildet die immunhistochemische Auswertung von Calretinin- und besonders Calbindin-exprimierenden Interneuronen. Letztere sind bei einer Schizophrenie ebenfalls von Verlusten gekennzeichnet (BEASLEY et al., 2002; REYNOLDS & HARTE, 2007), weshalb die tierexperimentelle Simulation dieser neuroanatomischen Veränderung zum Zwecke der Erforschung grundlegender Krankheitsmechanismen sowie therapeutischer Interventionen von Interesse wäre.

6.3.2.2 Immunologische Induktion Schizophrenie-typischer Symptome mittels pränataler Poly I:C-Behandlung

6.3.2.2.1 Untersuchung der dendritischen Komplexität präfrontaler Pyramidenneurone im Poly I:C-Modell

Aus der Untersuchung der dendritischen Komplexität im immunologischen Poly I:C-Modell der Schizophrenie gingen keine Effekte der Simulation einer Virus-Injektion *in utero* (GD 15) auf die neuronale Gesamtmorphologie präfrontaler (und hippocampaler)

Pyramidenzellen hervor. Auch eine postnatale Gabe des atypischen Neuroleptikums Risperidon (PND 34-47) zeigte diesbezüglich keinerlei Beeinflussung. Stattdessen wurde trotz unterschiedlicher prä- und postnataler Behandlungen eine sehr homogene präfrontale Nervenzellmorphologie zwischen den vier Versuchsgruppen festgestellt (s. auch Ergebnisse, Abschnitt 5.5.2.2.1). Aufgrund des zum Teil sehr geringen Stichprobenumfangs kann anhand der vorliegenden Daten allerdings nur eine vorläufige Aussage getroffen werden. Während die momentanen Ergebnisse gegen eine beeinträchtigte Morphologie kortikaler Pyramidenzellen infolge der pränatalen Applikation des Immunstimulans Poly I:C und/oder der Behandlung mit RIS während der Adoleszenz sprechen, kann die dendritische Komplexität hippokampaler CA1-Pyramidenneurone hinsichtlich möglicher degenerativer Verluste bzw. kompensatorischer Steigerungen nicht beurteilt werden. Somit lassen sich gemäß momentaner Datenlage auch die z. B. in den Tests auf latente Inhibition oder AMPH-induzierte Hyperlokomotion nachgewiesenen Verhaltensänderungen Poly I:C-exponierter Ratten gegenüber Kontrollen (ZUCKERMAN et al., 2003; PIONTKIEWITZ et al., 2011) auf neuroanatomischer Ebene nicht mit persistierenden gesamtmorphologischen Veränderungen medial-präfrontaler Pyramidenneurone in Zusammenhang bringen. Eine Behandlung mit RIS während der Adoleszenz der Tiere übte gleichermaßen keinerlei Effekte auf die dendritische Komplexität der Nervenzellen aus. LAW et al. (2004) stellten hingegen für den DG sowie verschiedene Kortexareale einen RIS-vermittelten Anstieg in der Expression des Mikrotubuli-assoziierten Proteins 2 (MAP2) und somit eine Einflussnahme des Neuroleptikums auf die Funktion und/oder Struktur entsprechender Dendritenbäume fest. Da aus der RIS-Gabe in der vorliegenden Arbeit keine strukturellen Veränderungen präfrontaler Dendritenbäume in Form erhöhter Verzweigungen resultierten, ist es einerseits möglich, dass RIS-induzierte dendritische Modifikationen auf spezifische Hirnregionen beschränkt sind und sich nicht für den mPFC nicht bestätigen lassen. Andererseits ist es denkbar, dass auch hier eine RIS-bedingte Steigerung der MAP2-Expression vorliegt und auf eine erhöhte dendritische Aktivität hindeutet, diese sich aber nicht in morphologischen Veränderungen der Dendriten niederschlägt (LAW et al., 2004).

6.3.2.2 Untersuchung der dendritischen Komplexität - vergleichende Betrachtung der zwei neuroentwicklungsbiologischen Rattenmodelle der Schizophrenie

Dem Ausbleiben von Behandlungsunterschieden im immunologischen Poly I:C-Modell der Schizophrenie entsprechend, konnten für das neurotoxische MAM-Modell, wie in Abschnitt 6.3.2.1.2 diskutiert, mittels Sholl-Analyse nur wenig verbreitete Substanz-Effekte auf die dendritische Komplexität nachgewiesen werden. Abgesehen von der unten beschriebenen methodischen Variabilität ist es daher, ähnlich wie bei der Quantifizierung PV⁺ Interneurone in verschiedenen präklinischen Schizophrenie-Modellen, möglich, dass die dendritische Komplexität kein hinreichend robuster Marker für den Nachweis Schizophrenie-typischer Alterationen in neuroentwicklungsbiologischen Tiermodellen ist. Wie von DAWE et al. (2009) im Zusammenhang mit dem pharmakologischen AMPH-Modell erwähnt, kann auch für die neuroentwicklungsbiologischen Tiermodelle grundsätzlich angenommen werden, dass in Abhängigkeit vom Versuchsdesign die mannigfaltigen neuroanatomischen und biochemischen Veränderungen im Gehirn von Schizophrenie-Patienten nur teilweise tierexperimentell generiert werden können.

Beim Vergleich der Sholl-Daten fiel sowohl für das Poly I:C- als auch das MAM-Modell v. a. bezüglich des Hippokampus ein sehr geringer Stichprobenumfang auf (Poly I:C: CA1; MAM: CA3), der die statistische Auswertung entweder unmöglich machte (Poly I:C) oder deren finale Aussagekraft erheblich beeinträchtigte (MAM). Die niedrige Anzahl analysierter Neurone lässt sich auf der einen Seite damit erklären, dass die Morphologie der Nervenzellen zwar vollständig, aber nicht rekonstruierbar abgebildet wurde. Das bedeutet, dass besonders in den Koronarschnitten, die sich durch eine starke Fluoreszenzmarkierung bzw. das Vorliegen zahlreicher gefärbter Zellen auszeichneten, vielfache Überlagerungen von Perikarya und proximalen sowie distalen Dendritenbäumen zustande kamen. Solche Zellen konnten zwar für die Spine-, nicht aber für die Sholl-Analyse eingeschlossen werden, da eine eindeutige Identifizierung und 3D-Rekonstruktion ihrer Gesamtmorphologie nicht möglich war. Auch unvollständige Nervenzellen konnten für die Evaluation der gesamten dendritischen Komplexität nicht herangezogen werden. In diesen Fällen war neben dem Soma nur der basale oder der apikale Dendritenbaum diolistisch markiert und der fehlende Teil nicht eindeutig zuordenbar. Auf der anderen Seite ist auch eine mangelnde Ausbeute wunschgemäß Dil-gefärbter Zellen als denkbare Ursache für den teilweise geringen Stichprobenumfang anzuführen und damit als Kritikpunkt der zugrundeliegenden Färbemethode zu sehen. Da die Effizienz der Gene Gun-Methode durch den Experimentator nur sehr wenig beeinflusst werden kann,

erscheint eine zuverlässige Optimierung des Markierungserfolgs schwierig. Möglich ist zwar ein mehrfacher Beschuss eines jeden Schnitts (GAN et al., 2000; GRUTZENDLER et al., 2003), aber durch eine drastische quantitative Steigerung gefärbter Neurone nimmt auch das Risiko der zuvor erwähnten interzellulären Überlappungen und damit der erschwerten individuellen Identifizierung zu. Auch die Homogenität der Präzipitation der Dil-ummantelten Wolframpartikel im Bullet-Schlauch kann lediglich über ein schnelles Arbeiten in dem Sinne, dass der Schlauch nach der Beladung mit den Dil-ummantelten Mikrocarriern zügig in die Station eingespannt und in Rotation versetzt wird, gesteuert werden. Da zudem eine geringe Variation zwischen wiederholten Durchgängen der Bullet-Herstellung nicht 100%ig ausgeschlossen werden kann, stellt auch die Bullet-Präparation keinen gesicherten Modulator des Färbeerfolgs dar.

6.3.2.2.3 Untersuchung synaptischer Dornfortsätze im Poly I:C-Modell

Aus der 3D-Spine-Analyse (Abb. 44ff) verschiedener mit einer Erkrankung an Schizophrenie assoziierter Gehirnareale im präklinischen immunologischen Poly I:C-Modell, welche nach bestem Wissen in der vorliegenden Dissertation erstmalig derart detailliert durchgeführt wurde, gingen differente Effekte der pränatalen Substanz-Exposition hervor. Sowohl in der Gesamtheit des mPFC als auch in dessen Subregion des cingulären Kortex (Cg1) bewirkte die *in utero*-Exposition mit Poly I:C verglichen mit Vehikelkontrollen überwiegend eine leichte (n. s.) Senkung der Spine-Dichte. Hinsichtlich der Thin-Spinezahl des mPFC führte die pränatale Poly I:C-Gabe zu einer signifikanten quantitativen Reduktion. Primär in Cg1, aber auch ansatzweise im gesamten mPFC fällt der besondere Poly I:C-Effekt auf die Stubby-Spines auf. Im Gegensatz zu den übrigen Spine-Klassen induzierte Poly I:C einen signifikanten Anstieg der Stubby-Spines in Cg1 und eine im Vergleich zu den Kontrolltieren fast identische Stubby-Anzahl im mPFC. Dadurch, dass Poly I:C die Dichte der Thin-Spines senkt und die der Stubby-Spines anhebt, ist davon auszugehen, dass die *in utero*-Exposition mit dem Immunstimulans zumindest zum Zeitpunkt der späten Adoleszenz die synaptische Übertragung im mPFC beschleunigt. Das lässt sich damit begründen, dass sich Thin- und Stubby-Spines aufgrund ihrer differenten Morphologie auch in ihrer internen Calcium-Regulation unterscheiden (SORRA & HARRIS, 2000). Die aus der Aktivierung der jeweiligen Synapse resultierende Calcium-induzierte postsynaptische Signalkaskade läuft in Spines mit längeren Hälsen langsamer ab als in solchen mit kurzen Hälsen, weshalb auch die

Calcium-Kompartimentierung in langhalsigen Spines länger bestehen bleibt (HERING & SHENG, 2001; BONHOEFFER & YUSTE, 2002). Da die Stubby-Spines im Vergleich zu den Thin-Spines keinen Hals besitzen (SORRA & HARRIS, 2000; TACKENBERG et al., 2009) ist davon auszugehen, dass die synaptische Signalweiterleitung in den Stubby-Spines schneller abläuft als in den Thin-Spines. Damit ruft die pränatale Poly I:C-Gabe Alterationen in einer Hirnregion hervor, deren Beeinträchtigung bei einer Erkrankung an Schizophrenie mit kognitiven Defiziten assoziiert ist. Das unterstützt die Aussage, dass mit Hilfe des Poly I:C-Modells u. a. ebenfalls kognitive Symptome tierexperimentell simuliert werden können (MACÊDO et al., 2012). Allerdings wurden anhand von *post mortem*-Untersuchungen einheitlich Reduktionen der Spine-Dichte in verschiedenen Hirnregionen von Schizophrenie-Patienten, wie z. B. in Lamina III des präfrontalen und temporalen Kortex (GAREY et al., 1998), festgestellt.

In der Schalenregion des NAcc ging die pränatale Verabreichung von Poly I:C gegenüber NaCl hingegen eher mit einer geringfügigen (nicht signifikanten) Erhöhung der Spine-Dichte insgesamt sowie jeder Klasse einher. Wurde die Poly I:C-Gabe jedoch mit einer RIS-Behandlung während der Adoleszenz der Tiere kombiniert, folgten daraus die genau gegensätzlichen Effekte auf die Spinezahlen. So hatte die Kombination aus Poly I:C und RIS gegenüber postnatal mit NaCl behandelten Poly I:C-Ratten im gesamten mPFC wie auch speziell in Cg1 mehrheitlich einen geringfügig stimulierenden Effekt auf die Spine-Dichte (nicht signifikant). In der Schalenregion des NAcc äußerte sich die kombinierte Substanzgabe im Vergleich zu postnatal mit NaCl behandelten Poly I:C-Nachkommen eher reduzierend (nicht signifikant). Daraus werden die Interaktionseffekte der beiden Einflussfaktoren - pränatale NaCl- oder Poly I:C-Exposition und postnatale NaCl- oder RIS-Behandlung - ersichtlich. Die Wechselwirkungen zwischen prä- und postnataler Behandlung drücken aus, dass die pränatale Poly I:C-Gabe in Abhängigkeit von der postnatalen NaCl- bzw. RIS-Applikation gegensätzliche Auswirkungen zeigte. Das bedeutet letztlich, dass die subchronische Behandlung der Tiere mit dem atypischen Neuroleptikum an den postnatalen Tagen 34 - 47 den jeweils nicht-signifikanten reduzierenden (mPFC) bzw. stimulierenden Poly I:C-Effekt (NAcc) auf die Dichte der dendritischen Spines zumindest ansatzweise kompensierte und auf das Level der Vehikeltiere zurückführte. Hierbei handelt es sich allerdings nur um eine Spekulation, die durch wiederholte Analysen dieser Art zu fundieren ist. Die Stubby-Spines der apikalen CA1-Dendriten betreffend ergab sich dennoch ebenfalls eine schwache Tendenz zu diesem Befund, wobei die RIS-Behandlung per se hier eine leichte Wirkung besaß (s. u.)

und im Vergleich zu NaCl-Tieren die Anzahl der Stubby-Spines geringfügig erhöhte (n. s.). Eindeutige kompensatorische RIS-Effekte, welche zuvor erwähnte Annahmen stützen, wurden für dieses Modell bereits in Bezug auf Poly I:C-induzierte neuroanatomische Defizite, wie Rückgang PV⁺ hippocampaler Interneurone (PIONTKEWITZ et al., 2012) oder Vergrößerung der lateralen Hirnventrikel (PIONTKEWITZ et al., 2011), sowie Verhaltensanomalien z. B. in Tests auf latente Inhibition oder AMPH-induzierte Hyperlokomotion nachgewiesen (ZUCKERMAN et al., 2003; PIONTKEWITZ et al., 2011).

Hinsichtlich der Spine-Daten striataler MSNs sowie der apikalen Dendriten pyramidalen CA1-Neurone, mit Ausnahme der Stubby-Spines, ließ sich keine statistisch signifikante Interaktion zwischen prä- und postnataler Behandlung der Tiere nachweisen. Unabhängig davon, ob den Ratten während ihrer Adoleszenz NaCl oder RIS verabreicht wurde, resultierte die Poly I:C-Exposition in einem tendenziellen Anstieg der Thin-Spines (statistischer Trend) striataler MSNs. Ein entsprechendes signifikantes Ergebnis lag für die Filopodia-Spines der CA1-Pyramidenzellen (apikale Dendriten) und ein schwacher Trend dazu ebenfalls für die Filopodia-Spines striataler MSNs vor. Daraus ist ersichtlich, dass die o. g. ansatzweise RIS-vermittelte (0,045 mg/kg KGW) Kompensation der Poly I:C-Effekte (4 mg/kg KGW) auf den mPFC und die Schalenregion des NAcc beschränkt war und sich weder im dorsalen Striatum noch in den Strata radiatum und lacunosum-moleculare der hippocampalen CA1-Region zeigte.

In Bezug auf die subchronische RIS-Gabe selbst konnten im Vergleich zu NaCl-behandelten Kontrollen signifikante Effekte ermittelt werden. Diese wirkten sich im mPFC stark reduzierend auf die Thin-Spines und in der Schalenregion des NAcc stimulierend auf die Filopodia-Spines aus. In beiden Fällen lagen außerdem dahingehend die bereits zuvor erläuterten Interaktionseffekte vor, dass die postnatale RIS-Behandlung in Abhängigkeit von der pränatalen NaCl- bzw. Poly I:C-Applikation entgegengesetzte Ergebnisse lieferte. Eine RIS-bedingte subtile und Hirnregion-spezifische Beeinflussung bestimmter Spine-Klassen ist auch daran zu erkennen, dass RIS ungeachtet der pränatalen Behandlung einerseits eine Reduktion der Stubby-Spines striataler MSNs, andererseits tendenziell (schwacher Trend) eine Erhöhung der Mushroom-Spines in CA1 (apikale Dendriten) auslöste. LAW et al. (2004) schlossen aufgrund des Fehlens von RIS-induzierten Veränderungen der mRNA des Spine-Markers Spinophilin darauf, dass das Neuroleptikum keine Auswirkungen auf die synaptischen Dornfortsätze im DG sowie verschiedenen Hippokampus- und Kortexarealen zeigt. Obwohl die in dieser Arbeit gewählte RIS-Dosis (0,045 mg/kg KGW) deutlich unter der lag, die LAW et al. (2004) einsetzten (0,5 mg/kg

KGW), sprechen die vorliegenden Resultate klar für die entgegengesetzte Hypothese. Diese lautet, dass Risperidon in Abhängigkeit vom Gehirnareal inhomogene Alterationen in der Quantität sowohl reifer als auch unreifer Subtypen dendritischer Spines hervorruft.

6.3.2.2.4 Untersuchung synaptischer Dornfortsätze - vergleichende Betrachtung zwischen Poly I:C- und Quinpirol-Modell

Die Gegenüberstellung von Quinp.- und Poly I:C-Modell hinsichtlich der jeweiligen Substanzeffekte auf die synaptischen Dornfortsätze spricht dafür, dass die pränatale Exposition mit dem Immunstimulans stärkere und räumlich weiter verbreitete Veränderungen in der Dichte verschiedener Spine-Subtypen hervorruft als die subchronische Quinp.-Behandlung im spät-adoleszenten bis adulten Zustand der Tiere. Während sich die Quinp.-bedingten Spineveränderungen primär auf die Kernregion des NAcc und tendenziell auf den mPFC bezogen, wirkte sich Poly I:C neben dem mPFC und dessen Subregion Cg1 auch in CA1 (apikale Dendriten) sowie ansatzweise im dorsalen Striatum und der Schalenregion des NAcc auf die Dichte verschiedener Spine-Typen aus. Einerseits ist der NAcc über die Stimulation postsynaptischer DA-D₂- und D₃-Rezeptoren wesentlich an der Expression der Quinp.-induzierten Verhaltenssensitivierung beteiligt (KOELTZOW et al., 2003), andererseits beeinflusste Quinp. vorrangig in dieser Hirnstruktur, die Teil des mesolimbischen Systems ist, die dendritischen Spines. Daraus kann gefolgert werden, dass die Quinp.-vermittelten Effekte auf die synaptischen Dornfortsätze im NAcc auf morphologischer Ebene mit denen auf das Verhalten der Tiere (lokomotorische Sensitivierung) verbunden sind. Die im Gegensatz dazu von Poly I:C vor allem im mPFC, aber auch in CA1 induzierten Alterationen der Spines spiegeln morphologische Beeinflussungen in Gehirnarealen wider, welche an kognitiven Funktionen beteiligt sind. Demnach ist es denkbar, dass die im Verhaltenstest nachgewiesene Beeinträchtigung der Ratten in der latenten Inhibition (ZUCKERMAN et al., 2003; PIONTKIEWITZ et al., 2011), die auch bei einer Erkrankung an Schizophrenie während der akuten psychotischen Phase auftritt und als kognitives Defizit gewertet wird (SWERDLOW et al., 1996; LUBOW, 2005), mit den subtilen morphologischen und möglicherweise synaptischen Modifikationen zusammenhängt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit Hilfe der etablierten diolistischen Fluoreszenzmarkierung sowie anschließender automatisierter 3D-Spine-Analyse sowohl für das pharmakologische Quinp.- als auch das immunologische Poly I:C-Modell der Schizophrenie Substanz-induzierte Veränderungen der synaptischen Dornfortsätze

gegenüber Verhikellkontrollen detektiert werden konnten. Diese ließen sich wenigstens ansatzweise mit den jeweils beobachteten Verhaltensanomalien in Einklang bringen. Da die Poly I:C- und Quinp.-vermittelte Beeinflussung der Thin-Spines im mPFC tendenziell gegensätzlich war (Poly I:C: reduzierend, Quinp.: leicht erhöhend), scheinen sich die beiden Tiermodelle durch jeweils charakteristische und Gehirnregion-spezifische Substanz-Effekte auf die morphologischen Feinstrukturen neuronaler Dendriten auszuzeichnen.

6.3.3 Genetische Induktion Schizophrenie-typischer Symptome mittels Expression des mutierten humanen *DISC1*-Gens (disrupted-in-schizophrenia-1)

6.3.3.1 Untersuchung synaptischer Dornfortsätze im mh*DISC1*-Modell

Die automatisierte 2D-Spine-Analyse distaler Körnerzellendriten im DG ergab keinerlei Unterschiede zwischen einzeltransgenen Kontrollen (CaMKII-tTA) und doppeltransgenen CaMKII-tTA x tet-h*DISC1*-Mäusen (vgl. Ergebnisse, Abschnitt 5.5.3.2). Da die Spine-Analyse in diesem genetischen Tiermodell zu einem Zeitpunkt während der Entwicklung der automatisierten 3D-Auswertung durchgeführt wurde, als die automatische Klassifikation noch nicht etabliert war, wurde hier lediglich eine Gesamt-Quantifizierung der Spines auf Basis zweidimensionaler Maximumintensitätsprojektionen der Original-LSM-Bilder vorgenommen. Weder bei differenzierter Auswertung von supra- und infrapyramidal lokalisierten Dendriten noch folgerichtig bei der zusammenfassenden Gesamtbetrachtung wurden Effekte der Expression des mh*DISC1*-Gens auf die Spine-Quantität im DG festgestellt. Dieser Befund lässt sich mit dem von PLETNIKOV et al. (2008) publizierten Ausbleiben mh*DISC1*-induzierter Effekte auf das Hippokampus-vermittelte räumliche Lernen und Erinnern der bitransgenen Mäuse vereinbaren. Die wenigen Erkenntnisse über mh*DISC1*-Auswirkungen auf die synaptischen Dornfortsätze der Körnerzellendriten des DG in dem hier verwendeten Tiermodell sind allgemein jedoch inhomogen. Während AYHAN et al. (2011) eine erhöhte Spinedichte der hippokampalen Granularzellen nachwiesen, stellten ABAZYAN und Kollegen (2010) diesbezüglich keine Transgen-bedingten Veränderungen fest. An dieser Stelle soll auf die hohe Variabilität verfügbarer Mauslinien der bitransgenen Tiere aufmerksam gemacht werden. So verwendeten AYHAN et al. (2011) ausschließlich die bitransgene Mauslinie 1001, welche auch für die vorliegende Arbeit zur Verfügung stand und in der das mutierte humane

DISC1-Gen stark exprimiert wird. Sowohl PLETNIKOV et al. (2008) als auch ABAZYAN et al. (2010) arbeiteten ebenfalls mit der Linie 1001, jedoch wurde in beiden Studien zusätzlich eine weitere Mauslinie eingesetzt, in der jeweils nur eine schwache Expression von *mhDISC1* vorliegt. Dabei handelte es sich um die Linien 70 (PLETNIKOV et al., 2008) bzw. 1302B (ABAZYAN et al., 2010). Die Mäuse der Linie 1302B unterscheiden sich außerdem in ihrer Abstammung von den übrigen zuvor erwähnten bitransgenen Tieren. Aufgrund der Verpaarung entsprechender einzeltransgener Mäuse (B6;SJL x B6;CBA) tragen die bitransgenen Nager der Linien 1001 und 70 einen aus drei Stämmen gemischten genetischen Hintergrund (B6;SJL;CBA) (PLETNIKOV et al., 2008), wohingegen Linie 1302B ausschließlich auf B6-Mäuse (C57BL6/J) zurückgeht (ABAZYAN et al., 2010). Das Arbeiten mit unterschiedlichen Mauslinien, die überdies teilweise in ihrer Genetik voneinander abweichen, beeinträchtigt die direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse und lässt damit keine fundierte Gesamtaussage zu. Dennoch steht das Fehlen von Transgen-Effekten in der hier durchgeführten Untersuchung im Gegensatz zu dem von AYHAN et al. (2011) publizierten signifikanten Anstieg der Spinedichte im DG bitransgener *mhDISC1*-Mäuse gegenüber einzeltransgenen Kontrollen, da in beiden Fällen Tiere der stark exprimierenden Mauslinie 1001 zum Einsatz kamen. Die vorliegenden Resultate lassen sich vielmehr mit den Ergebnissen von ABAZYAN und Kollegen (2010) in Einklang bringen, die bei gemischter Verwendung von Mäusen mit starker (1001) und schwacher Transgen-Expression (1302B) keine *mhDISC1*-induzierten Spine-Veränderungen im DG feststellten. Im Falle einer Durchmischung der Linien innerhalb einer Versuchstiergruppe kommt es schließlich in der Auswertung auch zu einer Vereinigung der Spine-Zahlen hippocampaler Granularzelldendriten bei starker und schwacher Expression des Transgens. Das kann letztlich zur Folge haben, dass gegenüber Kontrollen mögliche Unterschiede einer starken Expression des mutierten humanen *DISC1*-Gens durch die Folgen einer schwachen Expression abgemildert oder ausgeglichen werden und statistische Differenzen verschwinden. Somit erscheint es sinnvoll, auch bei einer identischen genetischen Abstammung unterschiedliche Mauslinien differenziert zu analysieren, um die Ergebnisbeeinflussung durch die variierende Transgen-Expression auszuschalten.

6.3.3.2 Quantifizierung kortikaler PV⁺ Interneurone im *mhDISC1*-Modell

Wie entsprechend zuvor für zwei pharmakologische (AMPH, Quinp.) und ein neuroentwicklungsbiologisches (MAM) Tiermodell der Schizophrenie beschrieben,

resultierten aus der Quantifizierung GABAerger PV⁺ Interneuronpopulationen im mPFC und DLFC auch für das hier verwendete genetische mh*DISC1*-Mausmodell keine Unterschiede zwischen einzel- und bitransgenen Tieren (s. Ergebnisse, Abb. 49). Dieser Befund stützt die Hypothese, dass die Auswertung PV⁺ Interneurone keinen zuverlässigen Marker für den Nachweis Schizophrenie-typischer Alterationen in präklinischen Ratten- bzw. Mausmodellen darstellt. Nichtsdestotrotz konnten sowohl AYHAN et al. (2011) als auch SHEN et al. (2008) Defizite in PV⁺ Interneuronpopulationen für dieses genetische Modell der Schizophrenie nachweisen. Während AYHAN et al. (2011) eine Reduktion PV⁺ Nervenzellen in verschiedenen Kortexarealen bitransgener Mäuse gegenüber einzeltransgenen Kontrollen feststellten, fanden SHEN et al. (2008) nicht nur kortikale, sondern auch hippokampale Verluste dieser Interneurone. Wie bereits oben im Zusammenhang mit den Resultaten der Spine-Analyse diskutiert, muss aber auch an dieser Stelle darauf verwiesen werden, dass in den zwei zuvor genannten Studien mit unterschiedlichen Tieren gearbeitet wurde. Nicht nur der genetische Hintergrund der Mäuse, d. h. deren Abstammung, sondern auch das Modell per se, d. h. die experimentelle genetische Intervention bezüglich *DISC1*, variierten. Demzufolge können die früheren Befunde nicht direkt miteinander verglichen werden. Aufgrund des Mangels an homogen reproduzierten Ergebnissen sowie der Unstimmigkeit zwischen den hier vorliegenden und den von AYHAN et al. (2011) veröffentlichten Daten ist eine finale Aussage über mh*DISC1*-induzierte histologische wie auch morphologische Modifikationen nicht möglich.

6.3.4 Abschließende Gesamtbeurteilung der verwendeten präklinischen Schizophrenie-Modelle

Neben pharmakologisch-induzierten Tiermodellen der Schizophrenie wurden in der vorliegenden Dissertation auch neuroentwicklungsbiologische sowie ein genetisches Modell auf mögliche durch den jeweiligen Insult hervorgerufene histologische und/oder morphologische Veränderungen untersucht. Die Quantifizierung kortikaler und hippokampaler PV⁺ Interneurone lieferte keine, die Evaluation der dendritischen Komplexität nur wenig aussagekräftige Ergebnisse. Mit Hilfe der automatisierten 3D-Analyse synaptischer Dornfortsätze konnten hingegen Tiermodell-abhängig v. a. für das Poly I:C-, aber auch das Quinp.-Modell (für AMPH kaum) subtile morphologische

Veränderungen infolge der jeweiligen Behandlung nachgewiesen werden. Da in dem immunologischen Tiermodell mittels pränataler Poly I:C-Exposition die quantitativen Alterationen verschiedener Spine-Subtypen am deutlichsten erkennbar waren, scheint die *in utero*-Beeinflussung der neuronalen Entwicklung im Vergleich zur Quinp.-Behandlung schwerwiegendere und bis in den adulten Zustand reichende Störungen der neuronalen Konnektivität und möglicherweise Funktionalität zu verursachen. Auf der Grundlage der hier durchgeführten Spine-Analyse sowie unter Berücksichtigung bereits publizierter Verhaltensdaten (ZUCKERMAN et al., 2003; PIONTKIEWITZ et al., 2011), welche sich mit den morphologischen Befunden vereinbaren lassen, wird das neuroentwicklungsbiologische Poly I:C-Modell zur Untersuchung Schizophrenie-typischer Veränderungen sowie entsprechender therapeutischer Interventionen empfohlen. Dennoch wurde in allen hier eingesetzten präklinischen Schizophrenie-Modellen generell nur ein Risikofaktor für die Entstehung der humanen Erkrankung tierexperimentell simuliert. Bei der Ätiopathogenese der Schizophrenie handelt es sich jedoch um einen multifaktoriellen Prozess (z. B. LEWIS & LIEBERMAN, 2000; SULLIVAN, 2005), weshalb es sinnvoll erscheint, für künftige Schizophrenie-bezogene Studien ein Zwei-Insult-Modell zu wählen. Aufgrund der Kombination der jeweiligen Substanz-Effekte kann von einer stärkeren Ausprägung der Schizophrenie-typischen Symptomatik in selektierten Verhaltenstests sowie deutlicheren neuroanatomischen Alterationen der entsprechenden Versuchstiere ausgegangen werden. Derartige Ansätze werden besonders unter Einschluss der Poly I:C-Exposition verfolgt, was die zuvor genannte Präferenz dieses Modells unterstreicht. So betrachteten z. B. Abazyan et al. (2010) nicht nur Effekte, die allein aus der Expression des *mhDISC1*-Gens resultierten, sondern kombinierten die genetische Induktion auch mit einer *in utero* Poly I:C-Exposition. Damit wurde ein genetischer, prädisponierender Risikofaktor gemeinsam mit einem pränatalen Umwelt-Risikofaktor für die Entstehung einer Schizophrenie im Tiermodell simuliert. GIOVANOLI et al. (2013) setzten neben demselben pränatalen Insult peripubertären Stress als zweiten „Störfaktor“ ein. Ähnliches wird derzeit auch in einer firmeninternen Studie vorgenommen, in der das Poly I:C-Modell um eine Phencyclidin-Behandlung der infantilen Tiere erweitert ist.

In den oben angesprochenen Spine-Evaluationen der vorliegenden Dissertation wurden sowohl das anteriore und zentrale dorsale Striatum als auch der präfrontale Kortex jeweils insgesamt betrachtet. Einerseits lässt sich aber das Striatum in verschiedene funktionsgebundene Subregionen differenzieren, andererseits kann auch eine Layer-spezifische Betrachtung des präfrontalen Kortex vorgenommen werden. Demnach ist es

empfehlenswert, in diesen beiden Gehirnnarealen präzise Unterbereiche für die Spine-Analyse zu definieren. Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Protokollierung der jeweiligen Lokalisation der Nervenzellen innerhalb des mPFC bzw. dorsalen Striatums während der Bildaufnahmen ist eine nachträgliche Layer- bzw. Subregion-spezifischere Zuordnung und Auswertung für präfrontale Pyramidenneurone sowie striatale MSNs durchaus möglich. Sowohl in der Quinp.- als auch der Poly I:C-Studie wurden primär dorsolateral („außen“, Richtung Kortex), dorsomedial („innen“, Richtung Lateral-Ventrikel) und zum Teil medial („Grenzbereich“ zwischen dorsolateral und -medial) im Striatum lokalisierte MSNs zusammengefasst analysiert. In einigen Fällen wurden auch ventrolateral bzw. -medial gelegene Neurone einbezogen. Während der dorsolaterale Anteil des Striatums in die Sensorimotorik involviert ist, sind dorsomediale und ventrale Subregionen jedoch für Lern- und Assoziationsprozesse wichtig (BALLEINE et al., 2009). Dementsprechend können mittels präziser Definition von Subregionen im dorsalen Striatum mögliche Substanz-induzierte morphologische Veränderungen mit bestimmten Verhaltensanomalien korreliert werden.

Für die Poly I:C-Studie wurde außerdem die Lokalisation der Pyramidenneurone innerhalb der untersuchten Subregionen des mPFC möglichst genau dokumentiert, so dass anhand dieser Angaben nachträglich ebenfalls eine weitgehende Differenzierung einzelner Schichten erfolgen kann. Die Layer-spezifische Zuordnung der Neurone erlaubt eine Aussage darüber, ob sich Poly I:C nur auf bestimmte präfrontale Zellen bzw. Nervenfasern auswirkt bzw. ob es schwerpunktmäßige Effekte gibt oder ob eher eine allgemeine und einheitliche morphologische Beeinflussung vorliegt. Da es sich wie oben erwähnt beim Poly I:C- und Quinp.-Modell um die Tiermodelle handelt, für die Substanz-induzierte Modifikationen der Spines auch in diesen beiden Hirnregionen ermittelt wurden, erscheint eine derartige retrospektive Differenzierung lohnenswert, um die gewonnen Erkenntnisse durch topologische Kriterien näher charakterisieren und funktionsbezogen beurteilen zu können.

7. Zusammenfassung

Linda Reimers

Neuronale Plastizität in Tiermodellen für neuropsychiatrische Erkrankungen

Fast alle exzitatorischen Synapsen des ausgereiften Säuger-Gehirns sind auf den Köpfen synaptischer Dornfortsätze (engl. spines) lokalisiert, was bedeutet, dass der erregende Input primär über diese kleinen postsynaptischen Membranvorwölbungen neuronaler Dendriten eintritt. Demnach leisten die Spines einen enormen Beitrag zu synaptischer Transmission und interneuronaler Konnektivität. Quantitative und strukturelle Modifikationen der Spines wurden für zahlreiche neurodegenerative und -psychiatrische Erkrankungen wie z. B. für Morbus Alzheimer und Schizophrenie v. a. mittels *post mortem*-Untersuchungen nachgewiesen. Schizophrenie ist eine schwerwiegende psychiatrische Erkrankung, deren Lebenszeitprävalenz mit einem bevorzugten Erkrankungsalter zwischen dem 15. und 35. Lebensjahr weltweit 0,5 bis 1,6 % beträgt. In Bezug auf die Gesamtheit der psychiatrischen Störungen zählt die Symptomatik schizophrener Psychosen zu den heterogensten, die nahezu alle psychischen Funktionen betrifft und sich zudem nur bedingt und meist nicht ohne Nebenwirkungen behandeln lässt.

Um die selbst heute noch nicht vollständig aufgeklärte Pathogenese der Schizophrenie, speziell subtile morphologische Veränderungen, besser zu verstehen und so die Optimierung der therapeutisch eingesetzten Antipsychotika voranzutreiben, war es die Intention dieser Dissertation, die synaptische Plastizität bzw. die Spines in verschiedenen Tiermodellen neuropsychiatrischer Erkrankungen zu untersuchen. Aufgrund der Lokalisation spezifischer Rezeptoren, welche z. B. während der medikamentösen Schizophrenie-Therapie als Angriffspunkte der Antipsychotika fungieren, auf den Köpfen der Spines sind die tierexperimentelle Reproduktion der humanen neuroanatomischen Alterationen sowie die Eignungsbeurteilung entsprechender präklinischer Modelle von essentieller Bedeutung. Dabei steht der Erkenntnisgewinn für die Entwicklung optimierter Medikamente, die im Idealfall weniger Nebenwirkungen bei verbessertem Effekt auf die heterogene Symptomatik zeigen, im Mittelpunkt.

In Hinblick darauf war das erste Arbeitsziel, die diolistische Fluoreszenzmarkierung via Gene Gun zur Visualisierung der Spines zusammen mit einer automatisierten 3D-Spine-Auswertung zu validieren und zu etablieren. Damit wurde letztlich angestrebt, die automatisierte 3D-Spine-Analyse auf Basis Gene Gun-markierter Strukturen als Standardmethode anstelle der bis dahin in der Arbeitsgruppe durchgeführten manuellen 2D-Spine-Evaluation anhand Golgi-Cox-gefärbter Spines einzuführen. Aufgrund des

Vorliegens von früheren mittels Golgi-gefärbter Strukturen in APPSWE-Mäusen gewonnen Spine-Analyse-Resultaten, die hier als Referenz zugrunde gelegt werden konnten, erfolgte die Etablierung des Markierungs- und Analyseverfahrens mit Hilfe dieses transgenen Mausmodells des Morbus Alzheimer. Im zweiten Arbeitsabschnitt wurden fünf verschiedene Nagermodelle der Schizophrenie u. a. mit Hilfe des zuvor etablierten Verfahrens neuroanatomisch charakterisiert. Dabei wurde von der detaillierten Spine-Analyse nicht nur erwartet, dass sie neue strukturelle und biochemische Erkenntnisse liefert, sondern auch, dass sie das Verständnis humaner pathologischer Mechanismen verbessert sowie bestenfalls die Entwicklung optimierter Antipsychotika fördert. Nach der Bestätigung der Konformität zwischen den jeweils manuell ermittelten 2D- und 3D-Werten der Spine-Dichte, welche sich aus der Auswertung Golgi-gefärbter bzw. Gene Gun-markierter Spines ergaben, galt die 2D-Spine-Auswertung (Golgi-Cox) durch die aus zeitlichen und methodischen Gründen zu bevorzugende 3D-Evaluation (Gene Gun) als substituiert. Danach wurden die Ergebnisse der manuellen 3D- mit denen der automatisierten 2D-Auswertung Gene Gun-markierter Spines korreliert. Die automatisierte Analyse beruhte dabei auf einem eigens für die Spine-Evaluation entwickelten Modul (2D-Algorithmus) innerhalb der Definiens Architect XD-Software. Aufgrund der hohen statistischen Signifikanz in der Korrelationsanalyse zwischen automatisiert erfasster 2D- und manuell ermittelter 3D-Spine-Dichte war der 2D-Algorithmus etabliert. Mit der Verifizierung der Anwendbarkeit des Markierungs- und Analyseverfahrens auf Spines in einem präklinischen Schizophrenie-Rattenmodell und der weiterführenden Entwicklung eines automatisierten 3D-Algorithmus wurde das Ziel, die Spines automatisiert zu quantifizieren und anhand ihrer Morphologie in Klassen zu differenzieren (Mushroom-, Thin-, Stubby-, Filopodia-Spines), erreicht. Eine statistische Korrelationsanalyse zwischen automatisiert gewonnenen 2D- und 3D-Spine-Zahlen bestätigte die Übereinstimmung der Daten und damit den Erfolg der automatisierten 3D-Spine-Analyse.

Das verifizierte Verfahren wurde dann genutzt, um weitere different induzierte Nagermodelle der Schizophrenie neuroanatomisch näher zu charakterisieren. Während anhand von *post mortem*-Untersuchungen vielfache pathologische Alterationen der Spines für Schizophrenie nachgewiesen wurden, liegen für die hier untersuchten Tiermodelle nur sehr wenige Befunde über Spine-Veränderungen vor, welche sich primär auf quantitative Aussagen beschränken und nur selten strukturelle Modifikationen der Spines einbeziehen. In dieser Arbeit wurden zum Teil erstmals in zwei pharmakologisch-induzierten (Amphetamin (AMPH), Quinpirol) und zwei neuroentwicklungsbiologischen

Rattenmodellen (Methylazoxymethanolacetat, Polyinosin-Polycytidylsäure (Poly I:C)) sowie in einem genetischen Mausmodell (mutiertes humanes *DISC1*-Gen (disrupted-in-schizophrenia-1)) der Schizophrenie mehrere Gehirnregionen, die in die Pathologie der humanen Erkrankung involviert sind, auf potentielle durch den jeweiligen Insult hervorgerufene Abweichungen in Spine-Dichte und -Morphologie untersucht. Daraus ergaben sich v. a. für das Poly I:C-, aber auch das Quinpirol- und nur sehr bedingt das AMPH-Modell signifikante quantitative Effekte des immunologischen bzw. pharmakologischen Insults auf spezifische Spine-Subtypen. Auch wenn die 3D-Spine-Analyse für das Poly I:C- verglichen mit dem Quinpirol- und AMPH-Modell die stärksten und räumlich am weitesten verbreiteten Spine-Veränderungen infolge der Substanz-Exposition *in utero* offenlegte, die z. B. auch in der hippokampalen CA1-Region (Cornu ammonis) nachweisbar waren, lagen dennoch in allen drei Tiermodellen signifikante Auswirkungen des jeweiligen Insults auf die Spines des Nukleus accumbens und bei Poly I:C sowie tendenziell bei Quinpirol zusätzlich des medialen präfrontalen Kortex vor. Das bedeutet, die hier durchgeführte automatisierte 3D-Spine-Analyse zeigte erstmals subtile tierexperimentell-erzeugte morphologische Veränderungen in Gehirnregionen, die beispielsweise für Kognition und Emotionalität essentiell und darüber hinaus mit der Positiv- und Negativsymptomatik der Schizophrenie assoziiert sind. Damit konnten die bisherigen Erkenntnisse über die verschiedenen Tiermodelle um den Nachweis einer Beeinflussung der synaptischen Plastizität ergänzt werden. Als elementares Resultat ist die vielfache Beeinflussung der Thin-Spines zu werten, welche primär glutamaterge NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptoren beherbergen. Diese Feststellung weist klar darauf hin, dass das glutamaterge Transmittersystem bei einer Erkrankung an Schizophrenie eine zentrale Rolle spielt und dies sowohl in der zukünftigen Auswahl geeigneter präklinischer Tiermodelle wie auch in der Entwicklung verbesserter Antipsychotika vorrangig berücksichtigt werden sollte.

Zur Fundierung der morphologischen Befunde wurde zusätzlich die dendritische Komplexität ausgewählter Hirnregionen ermittelt und/oder spezifische Interneuronpopulationen immunhistochemisch quantifiziert. Allerdings lieferte weder die Komplexitätsbestimmung der Dendriten noch die Quantifizierung kortikaler und hippokampaler Parvalbumin-positiver Interneurone aussagekräftige Ergebnisse, die einen Erkenntnisbeitrag zur neuroanatomischen Charakterisierung der Schizophrenie-Modelle hätten leisten können. Für das AMPH- und das Quinpirol-Modell wurde außerdem die lokomotorische Verhaltenssensitivierung nach wiederholter Substanz-Gabe mittels Open

Field-Test überprüft. Während für das Quinpirol-Modell dieses Phänomen in Form einer gesteigerten Reaktion der Tiere auf den Psychomotorik-stimulierenden Quinpirol-Effekt erfolgreich reproduziert wurde, blieb die AMPH-induzierte Verhaltenssensitivierung entgegen den Erwartungen aus. Da der Nukleus accumbens wesentlich in die Expression der Quinpirol-induzierten Verhaltenssensitivierung involviert ist, ist ein Zusammenhang mit der in dieser Hirnregion nachgewiesenen signifikanten Zunahme der Spine-Dichte durchaus denkbar. Das überwiegende Ausbleiben von Substanz-Effekten im AMPH-Modell lässt sich primär mit dem zugrunde gelegten Versuchsdesign (Kombination aus konsekutiver Applikation und vergleichsweise geringer Dosierung) begründen. Abschließend betrachtet lassen sich für beide Modelle die jeweils gewonnenen verhaltenspharmakologischen und morphologischen Daten miteinander vereinbaren.

Schlagworte: synaptische Dornfortsätze (Spines), automatisierte 3D-Spine-Analyse, Schizophrenie

8. Summary

Linda Reimers

Neuronal plasticity in animal models of neuropsychiatric diseases

Almost all excitatory synapses of the mammalian brain are located on the heads of dendritic spines, which means the excitatory input primarily enters by means of these small postsynaptic membrane protrusions on neuronal dendrites. Therefore, the dendritic spines crucially contribute to synaptic transmission and interneuronal connectivity. Quantitative as well as structural spine modifications have been shown *post mortem* for many neurodegenerative and -psychiatric diseases such as Morbus Alzheimer or schizophrenia. Schizophrenia is a devastating psychiatric disorder whose lifetime prevalence worldwide amounts to 0.5 till 1.6 %. The preferred age of onset of the disease is at 15 to 35 years. With regard to all psychiatric diseases, the symptoms of schizophrenic psychoses count among the most heterogeneous ones affecting nearly all psychic functions.

For a better understanding of the as yet only partly clarified pathogenesis of schizophrenia, especially of subtle morphologic changes, and to promote the optimization of therapeutically used antipsychotics, it was the intension of this work to analyze the role of synaptic plasticity, or more specific the role of dendritic spines in animal models of neuropsychiatric diseases. Due to the localization of specific receptors functioning as antipsychotic targets on the spine heads, not only the experimental reproduction of the human neuroanatomical alterations is of crucial importance but also the evaluation of preclinical animal models concerning their applicability. In this context obtaining new insights to facilitate the development of optimized drugs leading to fewer adverse events and improved positive drug effects at the same time is of central interest.

To that end, the first goal was to establish and to verify the diolistic fluorescence labeling technique using a hand-held gene gun to visualize neuronal morphology and dendritic spines in combination with a subsequent automated 3D-spine analysis. It was the aim to implement the gene gun-based automated 3D-spine analysis as standard procedure in place of the Golgi Cox-dependent 2D-spine evaluation used till then. Data of previous studies of dendritic spines that had been conducted based on Golgi Cox-stained spines of the CA1 hippocampal region in transgenic APPSWE-mice were used as a reference. Therefore, the establishment of the labeling and analysis method was realized by means of the murine APPSWE-model of Alzheimer's disease. The second goal was to apply the established technique for the neuroanatomical characterization of five differently induced

rodent models of schizophrenia. Thereby, the detailed spine analysis was not only expected to supply new structural and biochemical insights but also to improve the understanding of human pathological mechanisms as well as the development of optimized antipsychotics. After the conformity between manually determined 2D- and 3D-data of spine density, resulting from the quantification of Golgi-impregnated and gene gun-labeled spines, respectively, had been confirmed, the Golgi-based 2D-analysis was substituted by the gene gun-grounded 3D-evaluation which was preferred for temporal and methodical reasons. Thereafter, the spine densities quantified either in 3D manually or in 2D automatically on the basis of gene gun-labeled structures were correlated. For the automatically conducted quantification a module specifically developed for the spine analysis (2D-algorithm) within the Definiens Architect XD software was used. Due to the high statistical significance of the correlation analysis between the automatically 2D- and manually 3D-quantified spine densities the 2D-algorithm for the automated spine quantification was regarded as established. By means of first the verification of the adaptability of the labeling and analysis method to dendritic spines of a preclinical rat model of schizophrenia and second the intensified development of an automated 3D-algorithm, dendritic spines could not only be automatically quantified but also differentiated into several spine classes according to the subtype's morphology (mushroom, thin, stubby, filopodia spines). The agreement of the automatically acquired 2D- and 3D-spine numbers was confirmed by a statistical correlation analysis and thus the software-based 3D-spine analysis could be successfully established and exploited for further experiments.

Having achieved the first goal of the thesis, the verified labeling and 3D-analysis procedure was then used to study the role of neuroplasticity in further rodent models of schizophrenia. *Post mortem* studies showed numerous pathological alterations of dendritic spines among others for the brains of schizophrenic patients, whereas only a few findings about modifications of dendritic spines exist regarding the animal models of schizophrenia investigated here. These data are primarily confined to quantitative evaluations and very rarely include details about structural changes of the spines. In the present dissertation, partially for the first time, different brain regions being involved in the human pathology of schizophrenia were analyzed for potential insult-evoked alterations in spine density and morphology in two pharmacologically induced (amphetamine (AMPH), quinpirole) and two neurodevelopmental rat models (methylazoxymethanolacetate, polyinosinic-polycytidylic acid (poly I:C)) as well as in one genetic mouse model (mutant human *DISC1*-gene (disrupted-in-schizophrenia-1)) of schizophrenia. Especially for the poly I:C-model but also

for the quinpirole- and just very limited for the AMPH-model significant quantitative effects of the immunologic and pharmacologic insult, respectively, on specific spine subtypes were detected. Although the 3D-analysis revealed the strongest and spatially most prevalent changes of dendritic spines for the poly I:C-model compared to the quinpirole- and AMPH-model, for example being detectable also in the hippocampal CA1 (cornu ammonis) region, for all three just mentioned rat models significant impacts of the particular insult on the dendritic spines of the nucleus accumbens were demonstrated. In addition, spine modifications were found in the medial prefrontal cortex of poly I:C- and tendentially of quinpirole-treated animals. That means, for the first time, the automated 3D-spine analysis performed here for preclinical animal models of schizophrenia revealed subtle experimentally induced morphological alterations in brain regions being essential for processes such as cognition and emotion and besides being associated with the positive and negative symptoms of the human disease. So the available knowledge about the diverse animal models could be complemented by findings of insult-caused influences of synaptic plasticity. As fundamental outcome the frequent impact on thin spines elucidates the central role of the glutamatergic transmitter system during the pathogenesis of schizophrenia as thin spines house mainly glutamatergic NMDA (N-methyl-D-aspartate) receptors. This result should be taken into account urgently regarding the future selection of appropriate preclinical animal models and the development of improved antipsychotics. To support the morphological data obtained by 3D-spine analysis, the dendritic complexity of selected brain regions was determined and/or specific populations of interneurons were immunohistochemically quantified. However, neither the evaluation of the dendrites' complexity nor the quantification of cortical and hippocampal parvalbumin-immunoreactive interneurons yielded any convincing results that could have contributed some further insights concerning the neuroanatomical characterization of the animal models of schizophrenia.

In the two pharmacologically induced rat models (AMPH, quinpirole), behavioral sensitization after repeated drug treatment was additionally tested using the open field test. With respect to the quinpirole-model, this behavioral phenomenon in the form of an increased reaction of the animals to the psychomotor stimulating quinpirole-effects (hyperlocomotion) was successfully reproduced, while the expected AMPH-induced locomotor sensitization did not occur. Due to the fact that the nucleus accumbens is crucially involved in the expression of the quinpirole-evoked behavioral sensitization, a connection with the significant increase of spine density detected within this brain area is

definitely conceivable. The predominant absence of drug effects in the AMPH-model can primarily be justified by the underlying experimental design (combination of consecutive drug treatment and low dose). In conclusion, the behavioral and the morphological data obtained for each of the two models, respectively, are reconcilable.

Keywords: dendritic spines, automated 3D-spine analysis, schizophrenia

9. Referenzen

- ABAZYAN, B., J. NOMURA, G. KANNAN, K. ISHIZUKA, K.L. TAMASHIRO, F. NUCIFORA, V. POGORELOV, B. LADENHEIM, C. YANG, I.N. KRASNOVA, J.L. CADET, C. PARDO, S. MORI, A. KAMIYA, M.W. VOGEL, A. SAWA, C.A. ROSS & M.V. PLETNIKOV (2010): Prenatal interaction of mutant DISC1 and immune activation produces adult psychopathology. *Biological Psychiatry* 68: 1172-1181.
- ALEXOPOULOU, L., A. CZOPIK HOLT, R. MEDZHITOV & R.A. FLAVELL (2001): Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature* 413: 732-738.
- ALPÁR, A., U. UEBERHAM, M.K. BRÜCKNER, G. SEEGER, T. ARENDT & U. GÄRTNER (2006): Different dendrite and dendritic spine alterations in basal and apical arbors in mutant human amyloid precursor protein transgenic mice. *Brain Research* 1099: 189-198.
- ANDREASEN, N.C. (1982): Negative symptoms in schizophrenia. *Archives of General Psychiatry* 39: 784-788.
- ANDREASEN, N.C. & S. OLSEN (1982): Negative vs. positive schizophrenia. *Archives of General Psychiatry* 39: 789-794.
- ANDREASEN, N.C., M.-A. ROY & M. FLAUM (1995): Positive and negative symptoms. In: Hirsch, S.R. & D.R. Weinberger (Hrsg.): *Schizophrenia*. Blackwell Science; Oxford. S. 28-45.
- ARCHER, T. (2010): Neurodegeneration in schizophrenia. *Expert Review of Neurotherapeutics* 10: 1131-1141.
- ASHWELL, K.W.S. & W.S. WEBSTER (1986): Increased vascularity and alterations in cytochrome oxidase distribution associated with abnormal hippocampal cytoarchitecture in micrencephalic rats. *Developmental Brain Research* 30: 31-36.
- AYHAN, Y., B. ABAZYAN, J. NOMURA, R. KIM, B. LADENHEIM, I.N. KRASNOVA, A. SAWA, R.L. MARGOLIS, J.L. CADET, S. MORI, M.W. VOGEL, C.A. ROSS & M.V. PLETNIKOV (2011): Differential effects of prenatal and postnatal expressions of mutant human DISC1 on neurobehavioral phenotypes in transgenic mice: evidence for neurodevelopmental origin of major psychiatric disorders. *Molecular Psychiatry* 16: 293-306.
- BAHARNOORI, M., W.G. BRAKE & L.K. SRIVASTAVA (2009): Prenatal immune challenge induces developmental changes in the morphology of pyramidal neurons of the prefrontal cortex and hippocampus in rats. *Schizophrenia Research* 107: 99-109.
- BALLEINE, B.W., M. LILJEHOLM & S.B. OSTLUND (2009): The integrative function of the basal ganglia in instrumental conditioning. *Behavioral Brain Research* 199: 43-52.
- BARABAN, S.C., H.J. WENZEL, D.W. HOCHMAN & P.A. SCHWARTZKROIN (2000): Characterization of heterotopic cell clusters in the hippocampus of rats exposed to methylazoxymethanol in utero. *Epilepsy Research* 39: 87-102.

- BARTA, P.E., G.D. PEARLSON, R.E. POWERS, S.S. RICHARDS & L.E. TUNE (1990): Auditory hallucinations and smaller superior temporal gyral volume in schizophrenia. *American Journal of Psychiatry* 147: 1457-1462.
- BEASLEY, C.L., Z.J. ZHANG, I. PATTEN & G.P. REYNOLDS (2002): Selective deficits in prefrontal cortical GABAergic neurons in schizophrenia defined by the presence of calcium-binding proteins. *Biological Psychiatry* 52: 708-715.
- BJIJOU, Y., L. STINUS, M. LE MOAL & M. CADOR (1996): Evidence for selective involvement of dopamine D₁ receptors of the ventral tegmental area in the behavioral sensitization induced by intra-ventral tegmental area injections of D-amphetamine. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 277: 1177-1187.
- BONHOEFFER, T. & R. YUSTE (2002): Spine motility: phenomenology, mechanisms, and function. *Neuron* 35: 1019-1027.
- BROADBELT, K., W. BYNE & L.B. JONES (2002): Evidence for a decrease in basilar dendrites of pyramidal cells in schizophrenic medial prefrontal cortex. *Schizophrenia Research* 58: 75-81.
- BROWN, J.W., C.A. WHITEHEAD, A.M. BASSO, L.E. RUETER & M. ZHANG (2013): Preclinical evaluation of non-imidazole histamine H3 receptor antagonists in comparison to atypical antipsychotics for the treatment of cognitive deficits associated with schizophrenia. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 16: 889-904.
- CADET, J.L., I.N. KRASNOVA, S. JAYANTHI & J. LYLES (2007): Neurotoxicity of substituted amphetamines: molecular and cellular mechanisms. *Neurotoxicity Research* 11: 183-202.
- CAHN, W., H.E. HULSHOFF POL, E.B.T.E. LEMS, N.E.M. VAN HAREN, H.G. SCHNACK, J.A. VAN DER LINDEN, P.F. SCHOTHORST, H. VAN ENGELAND & R.S. KAHN (2002): Brain volume changes in first-episode schizophrenia. *Archives of General Psychiatry* 59: 1002-1010.
- CAHN, W., N.E.M. VAN HAREN, H.E. HULSHOFF POL, H.G. SCHNACK, E. CASPERS, D.A.J. LAPONDER & R.S. KAHN (2006): Brain volume changes in the first year of illness and 5-year outcome of schizophrenia. *The British Journal of Psychiatry* 189: 381-382.
- CARTER, A. & B. SABATINI (2008): Spine calcium signaling. In: STUART, G., N. SPRUSTON & M. HÄUSSER (Hrsg.): *Dendrites*. 2. Aufl., Oxford University Press Inc.; New York. S. 287-308.
- CATTABENI, F., M.P. ABBRACCHIO, M. CIMINO, D. COCCHI, M. DI LUCA, L. MENNUNI, F. ROSI & P. ZARATIN (1989): Methylazoxymethanol-induced microencephaly: persistent increase of cortical somatostatin-like immunoreactivity. *Developmental Brain Research* 47: 156-159.
- CHEVASSUS-AU-LOUIS, N., A. RAFIKI, I. JORQUERA, Y. BEN-ARI & A. REPRESA (1998): Neocortex in the hippocampus: an anatomical and functional study of CA1 heterotopias after prenatal treatment with methylazoxymethanol in rats. *The Journal of Comparative Neurology* 394: 520-536.
- CHIN, C.-L., P. CURZON, A.J. SCHWARTZ, E.M. O'CONNOR, L.E. RUETER, G.B. FOX, M. DAY & A.M. BASSO (2011): Structural abnormalities revealed by magnetic resonance imaging in

rats prenatally exposed to methylazoxymethanol acetate parallel cerebral pathology in schizophrenia. *Synapse* 65: 393-403.

COYLE, J.T., G. TSAI & D. GOFF (2003): Converging evidence of NMDA receptor hypofunction in the pathophysiology of schizophrenia. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1003: 318-327.

DAWE, G.S., E.H.J. HWANG & C.H. TAN (2009): Pathophysiology and animal models of schizophrenia. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore* 38: 425-430.

DEISTER, A. & H.-J. MÖLLER (1998): Schizophrenie und verwandte Psychosen. Ein Kompendium für Ärzte und Studierende. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; Stuttgart.

DEKOSKY, S.T. & S.W. SCHEFF (1990): Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Annals of Neurology* 27: 457-464.

DVORKIN, A., K.E. CULVER, D. WAXMAN, H. SZECHTMAN & B. KOLB (2008): Effects of hypophysectomy on compulsive checking and cortical dendrites in an animal model of obsessive-compulsive disorder. *Behavioural Pharmacology* 19: 271-283.

FATEMI, S.H. & T.D. FOLSOM (2009): The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia, revisited. *Schizophrenia Bulletin* 35: 528-548.

FIALA, J.C., J. SPACEK & K.M. HARRIS (2008): Dendrite structure. In: STUART, G., N. SPRUSTON & M. HÄUSSER (Hrsg.): *Dendrites*. 2. Aufl., Oxford University Press Inc.; New York. S. 1-41.

FREISSMUTH, M., S. OFFERMANN & S. BÖHM (2012): *Pharmakologie & Toxikologie: Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie*. Heidelberg; Springer Medizin Verlag.

GAEBEL, W. & P. FALKAI (Redaktion) (1998): *Praxisleitlinien in Psychiatrie und Psychotherapie; Band 1: Behandlungsleitlinie Schizophrenie*. Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie, Psychotherapie und Nervenheilkunde (DGPPN) (Hrsg.). Steinkopff Verlag; Darmstadt.

GALLINAT, J. & Y. GUDLOWSKI (2008): Die Glutamathypothese der Schizophrenie. *Nervenheilkunde* 27: 317-325.

GAN, W.-B., J. GRUTZENDLER, W.T. WONG, R.O.L. WONG & J.W. LICHTMAN (2000): Multicolor "DiOlistic" labeling of the nervous system using lipophilic dye combinations. *Neuron* 27: 219-225.

GARBOSSA, D. & A. VERCELLI (2003): Experimentally-induced microencephaly: effects on cortical neurons. *Brain Research Bulletin* 60: 329-338.

GAREY, L.J., W.Y. ONG, T.S. PATEL, M. KANANI, A. DAVIS, A.M. MORTIMER, T.R.E. BARNES & S.R. HIRSCH (1998): Reduced dendritic spine density on cerebral cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 65: 446-453.

- GASTAMBIDE, F., M.-C. COTEL, G. GILMOUR, M.J. O'NEILL, T.W. ROBBINS & M.D. TRICKLEBANK (2012): Selective remediation of reversal learning deficits in the neurodevelopmental MAM model of schizophrenia by a novel mGlu5 positive allosteric modulator. *Neuropsychopharmacology* 37: 1057-1066.
- GEHLERT, D.R., S.L. GACKENHEIMER, P. SEEMAN & J. SCHAUS (1992): Autoradiographic localization of [3H]quinpirole binding to dopamine D2 and D3 receptors in rat brain. *European Journal of Pharmacology* 211: 189-194.
- GIOVANOLI, S., H. ENGLER, A. ENGLER, J. RICHETTO, M. VOGET, R. WILLI, C. WINTER, M.A. RIVA, P.B. MORTENSEN, M. SCHEDLOWSKI & U. MEYER (2013): Stress in puberty unmasks latent neuropathological consequences of prenatal immune activation in mice. *Science* 339: 1095-1099.
- GLANTZ, L.A. & D.A. LEWIS (2000): Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *Archives of General Psychiatry* 57: 65-73.
- GOULD, T.D., D.T. DAO & C.E. KOVACSICS in T.D. GOULD (Hrsg.) (2009): Mood and anxiety related phenotypes in mice, chapter 1: The open field test. *Neuromethods* 42: 1-20.
- GRUEN, R.J., S. STOKER, A.J. FRIEDHOFF & C.W. BRADBERRY (1999): Effects of repeated amphetamine treatment on regional GABA_A receptor binding. *Brain Research* 825: 180-182.
- GRUTZENDLER, J., J. TSAI & W.-B. GAN (2003): Rapid labeling of neuronal populations by ballistic delivery of fluorescent dyes. *Methods* 30: 79-85.
- GUILLIN, O., A. ABI-DARGHAM & M. LARUELLE (2007): Neurobiology of dopamine in schizophrenia. *International Reviews of Neurobiology* 78: 1-39.
- GUR, R.E., B.I. TURETSKY, W.B. BILKER & R.C. GUR (1999): Reduced gray matter volume in schizophrenia. *Archives of General Psychiatry* 56: 905-911.
- HÄFNER, H., A. RIECHER, K. MAURER, B. FÄTKENHEUER, W. LÖFFLER, W. AN DER HEIDEN, P. MUNK-JØRGENSEN & E. STRÖMGREN (1991): Geschlechtsunterschiede bei schizophrenen Erkrankungen. *Fortschritte der Neurologie - Psychiatrie* 59: 343-360.
- HALL, C.S. & E.L. BALLACHEY (1932): A study of the rat's behavior in a field: a contribution to method in comparative psychology. *University of California Publications in Psychology* 6: 1-12.
- HARRIS, K.M. & S.B. KATER (1994): Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annual Review of Neuroscience* 17: 341-371.
- HÉDOU, G., A.L. JONGEN-RÊLO, C.A. MURPHY, C.A. HEIDBREDER & J. FELDON (2002): Sensitized Fos expression in subterritories of the rat medial prefrontal cortex and nucleus accumbens following amphetamine sensitization as revealed by stereology. *Brain Research* 950: 165-179.

- HENZE, R., R. BRUNNER, U. THIEMANN, P. PARZER, J. KLEIN, F. RESCH & B. STIELTJES (2012): White matter alterations in the corpus callosum of adolescents with first-admission schizophrenia. *Neuroscience Letters* 513: 178-182.
- HERING, H. & M. SHENG (2001): Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nature Reviews Neuroscience* 2: 880-888.
- HILL K., L. MANN, K.R. LAWS, C.M.E. STEPHENSON, I. NIMMO-SMITH & P.J. MCKENNA (2004): Hypofrontality in schizophrenia: a meta-analysis of functional imaging studies. *Acta Psychiatrica Scandinavica* 110: 243-256.
- HSIAO, K., P. CHAPMAN, S. NILSEN, C. ECKMAN, Y. HARIGAYA, S. YOUNKIN, F. YANG & G. COLE (1996): Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274: 99-102.
- INTA, D., A. MEYER-LINDENBERG & P. GASS (2011): Alterations in postnatal neurogenesis and dopamine dysregulation in schizophrenia: a hypothesis. *Schizophrenia Bulletin* 37: 674-680.
- ISHIZUKA, N., W.M. COWAN & D.G. AMARAL (1995): A quantitative analysis of the dendritic organization of pyramidal cells in the rat hippocampus. *Journal of Comparative Neurology* 362: 17-45.
- JONES, S.R., R.R. GAINETDINOV, R.M. WIGHTMAN & M.G. CARON (1998): Mechanisms of amphetamine action revealed in mice lacking the dopamine transporter. *The Journal of Neuroscience* 18: 1979-1986.
- JONES, P.B. & P.F. BUCKLEY (2006): *Schizophrenia*. Churchill Livingstone Elsevier; London.
- JONES, C.K., N. BYUN & M. BUBSER (2012): Muscarinic and nicotinic acetylcholine receptor agonists and allosteric modulators for the treatment of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology Reviews* 37: 16-42.
- KALIVAS, P.W. (1995): Interactions between dopamine and excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychostimulants. *Drug and Alcohol Dependence* 37: 95-100.
- KAUER, J.A. & R.C. MALENKA (2007): Synaptic plasticity and addiction. *Nature Reviews Neuroscience* 8: 844-858.
- KAWARABAYASHI, T., L.H. YOUNKIN, T.C. SAIDO, M. SHOJI, K.H. ASHE & S.G. YOUNKIN (2001): Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid β protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience* 21: 372-381.
- KESHAVAN, M.S., R. TANDON, N.N. BOUTROS & H.A. NASRALLAH (2008): Schizophrenia, "just the facts": What we know in 2008. Part 3: Neurobiology. *Schizophrenia Research* 106: 89-107.
- KIM, Y., M.A. TEYLAN, M. BARON, A. SANDS, A.C. NAIRN & P. GREENGARD (2009): Methylphenidate-induced dendritic spine formation and Δ FosB expression in nucleus

accumbens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 106: 2915-2920.

KLEIN, T.M., E.D. WOLF, R. WU & J.C. SANFORD (1987): High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327: 70-73.

KLINK, R., P. BOKSA & R. JOOBER (2003): Pharmacogenomics and animal models of schizophrenia. *Drug Development Research* 60: 95-103.

KOELTZOW, T.E., J.D. AUSTIN & P. VEZINA (2003): Behavioral sensitization to quinpirole is not associated with increased nucleus accumbens dopamine overflow. *Neuropharmacology* 44: 102-110.

KRAMS, M., S.O. FRAHM, U. KELLNER & C. MAWRIN (2010): *Kurzlehrbuch Pathologie*. Georg Thieme Verlag; Stuttgart, New York. S. 454-455.

KURACHI, M. (2003): Pathogenesis of schizophrenia: Part I. Symptomatology, cognitive characteristics and brain morphology. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 57: 3-8.

KURZ, A. (2013): *Das Wichtigste über die Alzheimer-Krankheit und andere Demenzformen*. Schriftenreihe der Deutschen Alzheimer Gesellschaft e. V.; 23. aktualisierte Aufl.; Meta Druck; Berlin.

LARUELLE, M. (2000): The role of endogenous sensitization in the pathophysiology of schizophrenia: Implications from recent brain imaging studies. *Brain Research Reviews* 31: 371-384.

LAW, A.J., L.J. HUTCHINSON, P.W.J. BURNET & P.J. HARRISON (2004): Antipsychotics increase microtubule-associated protein 2 mRNA but not spinophilin mRNA in rat hippocampus and cortex. *Journal of Neuroscience Research* 76: 376-382.

LAZAR, N.L., R.W.J. NEUFELD & D.P. CAIN (2011): Contribution of nonprimate animal models in understanding the etiology of schizophrenia. *Journal of Psychiatry and Neuroscience* 36: E5-29.

LEWIS, D.A., J.N. PIERRI, D.W. VOLK, D.S. MELCHITZKY & T.-U.W. WOO (1999): Altered GABA neurotransmission and prefrontal cortical dysfunction in schizophrenia. *Biological Psychiatry* 46: 616-626.

LEWIS, D.A. & J.A. LIEBERMAN (2000): Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron* 28: 325-334.

LEWIS, D.A., T. HASHIMOTO & D.W. VOLK (2005): Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nature Reviews Neuroscience* 6: 312-324.

LEWIS, D.A. & G. GONZÁLEZ-BURGOS (2008): Neuroplasticity of neocortical circuits in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology Reviews* 33: 141-165.

LEWIS, D.A., A.A. CURLEY, J.R. GLAUSIER & D.W. VOLK (2012): Cortical parvalbumin interneurons and cognitive dysfunction in schizophrenia. *Trends in Neuroscience* 35: 57-67.

- LI, Y., B. KOLB & T.E. ROBINSON (2003): The location of persistent amphetamine-induced changes in the density of dendritic spines on medium spiny neurons in the nucleus accumbens and caudate-putamen. *Neuropsychopharmacology* 28: 1082-1085.
- LIEBERMAN, J.A., D. PERKINS, A. BELGER, M. CHAKOS, F. JARSKOG, K. BOTEVA & J. GILMORE (2001): The early stages of schizophrenia: speculations on pathogenesis, pathophysiology, and therapeutic approaches. *Biological Psychiatry* 50: 884-897.
- LIEBERMAN, J.A. (2004): Dopamine partial agonists. A new class of antipsychotic. *CNS Drugs* 18: 251-267.
- LILLRANK, S.M., B.K. LIPSKA & D.R. WEINBERGER (1995): Neurodevelopmental animal models of schizophrenia. *Clinical Neuroscience* 3: 98-104.
- LIPPA, C.F., J.E. HAMOS, D. PULASKI-SALO, L.J. DEGENNARO & D.A. DRACHMAN (1992): Alzheimer's disease and aging: effects on perforant pathway perikarya and synapses. *Neurobiology of Aging* 13: 405-411.
- LODGE, D.J., M.M. BEHRENS & A.A. GRACE (2009): A Loss of parvalbumin-containing interneurons is associated with diminished oscillatory activity in an animal model of schizophrenia. *The Journal of Neuroscience* 29: 2344-2354.
- LOMANOWSKA, A., S. GORMLEY & H. SZECHTMAN (2004): Presynaptic stimulation and development of locomotor sensitization to the dopamine agonist quinpirole. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 77: 617-622.
- LUBOW, R.E. (2005): Construct validity of the animal latent inhibition model of selective attention deficits in schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin* 31: 139-153.
- MACÊDO, D.S, D.P. ARAÚJO, L.R.L. SAMPAIO, S.M.M. VASCONCELOS, P.M.G. SALES, F.C.F. SOUSA, J.E. HALLAK, J.A. CRIPPA AND A.F. CARVALHO (2012): Animal models of prenatal immune challenge and their contribution to the study of schizophrenia: a systematic review. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 45: 179-186.
- MAKINODAN, M., K. TATSUMI, T. MANABE, T. YAMAUCHI, E. MAKINODAN, H. MATSUYOSHI, S. SHIMODA, Y. NORIYAMA, T. KISHIMOTO, & A. WANAKA (2008): Maternal immune activation in mice delays myelination and axonal development in the hippocampus of the offspring. *Journal of Neuroscience Research* 86: 2190-2200.
- MARAGOS, W.F., J.T. GREENAMYRE, J.B. PENNEY, JR. & A.B. YOUNG (1987): Glutamate dysfunction in Alzheimer's disease: a hypothesis. *Trends in Neuroscience* 65-68.
- MASLIAH, E., R.D. TERRY, M. ALFORD, R. DETERESA & L.A. HANSEN (1991): Cortical and subcortical patterns of synaptophysinlike immunoreactivity in Alzheimer's disease. *American Journal of Pathology* 138: 235-246.
- MATRICON, J., A. BELLON, H. FRIELING, O. KEBIR, G. LE PEN, F. BEUVON, C. DAUMAS-DUPORT, T.M. JAY & M.-O. KREBS (2010): Neuropathological and reelin deficiencies in the hippocampal formation of rats exposed to MAM; differences and similarities with schizophrenia. *Public Library of Science One* 5: e10291.

- MATSUZAKI, M. (2007): Factors critical for plasticity of dendritic spines and memory storage. *Neuroscience Research* 57: 1-9.
- MATTSON, M.P. (2004): Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430: 631-639.
- MAYNARD, T.M., L. SIKICH, J.A. LIEBERMAN & A.-S. LAMANTIA (2001): Neural development, cell-cell signaling, and the "two-hit" hypothesis of schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin* 27: 457-476.
- MCGRATH, J., S. SAHA, J. WELHAM, O. EL SAADI, C. MACCAULEY & D. CHANT (2004): A systematic review of the incidence of schizophrenia: the distribution of rates and the influence of sex, urbanicity, migrant status and methodology. *BioMed Central Medicine* 2: 13.
- MEGÍAS, M., Z.S. EMRI, T.F. FREUND & A.I. GULYÁS (2001): Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience* 102: 527-540.
- MILLAR, J.K., J.C. WILSON-ANNAN, S. ANDERSON, S. CHRISTIE, M.S. TAYLOR, C.A. SEMPLE, R.S. DEVON, D.M. ST. CLAIR, W.J. MUIR, D.H. BLACKWOOD & D.J. PORTEOUS (2000): Disruption of two novel genes by translocation co-segregating with schizophrenia. *Human Molecular Genetics* 9: 1415-1423.
- MOORE, H., J.D. JENTSCH, M. GHAJARNIA, M.A. GEYER & A.A. GRACE (2006): A neurobehavioral systems analysis of adult rats exposed to methylazoxymethanol acetate on E17: implications for the neuropathology of schizophrenia. *Biological Psychiatry* 60: 253-264.
- MORSHEDI, M.M. & G.E. MEREDITH (2007): Differential laminar effects of amphetamine on prefrontal parvalbumin interneurons. *Neuroscience* 149: 617-624.
- MÜLLER, N. & M. RIEDEL (2002): Weniger Nebenwirkungen! Therapie mit atypischen Neuroleptika. *Pharmazie in unserer Zeit* 6: 558-564.
- MÜLLER, W.E. (2002): Wie wirken Clozapin & Co.? Wirkungsmechanismen der atypischen Neuroleptika. *Pharmazie in unserer Zeit* 6: 537-544.
- O'BRIEN, J.A. & S.C.R. LUMMIS (2004): Biolistic and diolistic transfection: using the gene gun to deliver DNA and lipophilic dyes into mammalian cells. *Methods* 33: 121-125.
- O'BRIEN, J.A. & S.C.R. LUMMIS (2006): Diolistic labeling of neuronal cultures and intact tissue using a hand-held gene gun. *Nature Protocols* 1:1517-1521.
- O'CARROLL, R. (2000): Cognitive impairment in schizophrenia. *Advances in Psychiatric Treatment* 6:161-168.
- OLBRICH, H.M., S. LEUCHT, J. FRITZE, M.H. LANCIK & R. VAUTH (2004): Schizophrenien und andere psychotische Störungen. In: BERGER, M. (Hrsg.): *Psychische Erkrankungen. Klinik und Therapie*. 2. Aufl.; Urban & Fischer Verlag; München, Jena. S. 453-540.

- PANNESE, E. (1996): The black reaction. *Brain Research Bulletin* 41: 343-349.
- PAXINOS, G. & C. WATSON (1998): The rat brain in stereotaxic coordinates. London, San Diego. - 4. Aufl., Academic Press.
- PAXINOS, G. & C. WATSON (1998): The rat brain in stereotaxic coordinates. 4. Aufl.; Academic Press; London, San Diego.
- PAXINOS, G. & K.B.J. FRANKLIN (2001): The mouse brain in stereotaxic coordinates. 2. Aufl.; Academic Press; San Diego, London.
- PAXINOS, G. & C. WATSON (2007): The rat brain in stereotaxic coordinates. 6. Aufl.; Academic Press; London, Amsterdam, Burlington.
- PELEG-RAIBSTEIN, D., I. KNUESSEL & J. FELDON (2008): Amphetamine sensitization in rats as an animal model of schizophrenia. *Behavioural Brain Research* 191: 190-201.
- PELEG-RAIBSTEIN, D., B.K. YEE, J. FELDON & J. HAUSER (2009): The amphetamine sensitization model of schizophrenia: relevance beyond psychotic symptoms? *Psychopharmacology* 206: 603-621.
- PENSCHUCK, S., P. FLAGSTAD, M. DIDRIKSEN, M. LEIST & A.T. MICHAEL-TITUS (2006): Decrease in parvalbumin-expressing neurons in the hippocampus and increased phencyclidine-induced locomotor activity in the rat methylazoxymethanol (MAM) model of schizophrenia. *European Journal of Neuroscience* 23: 279-284.
- PEREZ-CRUZ, C., J.I.H. MÜLLER-KEUKER, U. HEILBRONNER, E. FUCHS & G. FLÜGGE (2007): Morphology of pyramidal neurons in the rat prefrontal cortex: lateralized dendritic remodeling by chronic stress. *Neural Plasticity* 2007.
- PEREZ-CRUZ, C., M.W. NOLTE, M.M. VAN GAALEN, N.R. RUSTAY, A. TERMONT, A. TANGHE, F. KIRCHHOFF & U. EBERT (2011): Reduced spine density in specific regions of CA1 pyramidal neurons in two transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience* 31: 3926-3934.
- PERRY, E. (1988): Acetylcholine and Alzheimer's disease. *The British Journal of Psychiatry* 152: 737-740.
- PHILLIPS, T.J., R. PASTOR, A.C. SCIBELLI, C. REED & E. TARRAGÓN in J. Raber (Hrsg.) (2011): Behavioral sensitization to addictive drugs: clinical relevance and methodological aspects. In: RABER, J. (Hrsg.): *Animal models of behavioral analysis*. *Neuromethods* 50: 267-305.
- PIERCE, R.C. & P.W. KALIVAS (1997): A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Research Reviews* 25: 192-216.
- PIONTKEWITZ, Y., Y. ASSAF & I. WEINER (2009): Clozapine administration in adolescence prevents postpubertal emergence of brain structural pathology in an animal model of schizophrenia. *Biological Psychiatry* 66: 1038-1046.
- PIONTKEWITZ, Y., M. ARAD & I. WEINER (2011): Risperidone administered during asymptomatic period of adolescence prevents the emergence of brain structural pathology

and behavioral abnormalities in an animal model of schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin* 37: 1257-1269.

PIONTKEWITZ, Y., H.-G. BERNSTEIN, H. DOBROWOLNY, B. BOGERTS, I. WEINER & G. KEILHOFF (2012): Effects of risperidone treatment in adolescence on hippocampal neurogenesis, parvalbumin expression, and vascularization following prenatal immune activation in rats. *Brain, Behavior, and Immunity* 26: 353-363.

PLETNIKOV, M.V., Y. AYHAN, O. NIKOLSKAIA, Y. XU, M.V. OVANESOV, H. HUANG, S. MORI, T.H. MORAN & C.A. ROSS (2008): Inducible expression of mutant human DISC1 in mice is associated with brain and behavioral abnormalities reminiscent of schizophrenia. *Molecular Psychiatry* 13: 173-186.

POLLEUX, F. & A. GHOSH (2008): Molecular determinants of dendrite and spine development. In: STUART, G., N. SPRUSTON & M. HÄUSSER (Hrsg.): *Dendrites*. 2. Aufl., Oxford University Press Inc.; New York. S. 95-115.

PRUT, L. & C. BELZUNG, (2003): The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology* 463: 3-33.

RAPOPORT, J.L., A.M. ADDINGTON, S. FRANGOU & M.R.C. PSYCH (2005): The neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2005. *Molecular Psychiatry* 10: 434-449.

REISBERG, B., R. DOODY, A. STÖFFLER, F. SCHMITT, S. FERRIS & H.J. MÖBIUS (2003): Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine* 348: 1333-1341.

REMSCHMIDT, H. & F.M. THEISEN (2011): *Schizophrenie: Manuale psychischer Störungen bei Kindern und Jugendlichen*. Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York.

RICHTAND, N.M. (2006): Behavioral sensitization, alternative splicing, and D3 dopamine receptor-mediated inhibitory function. *Neuropsychopharmacology* 31: 2368-2375.

REYNOLDS, G.P. & M.K. HARTE (2007): The neuronal pathology of schizophrenia: molecules and mechanisms. *Biochemical Society Transactions* 35, part 2: 433-436.

ROBERTS, R.C., R. CONLEY, L. KUNG, F.J. PERETTI & D.J. CHUTE (1996): Reduced striatal spine size in schizophrenia: a postmortem ultrastructural study. *Neuro Report* 7: 1214-1218.

ROBINSON, T.E & B. KOLB (1997): Persistent structural modifications in nucleus accumbens and prefrontal cortex neurons produced by previous experience with amphetamine. *The Journal of Neuroscience* 17: 8491-8497.

ROBINSON, T.E & B. KOLB (1999): Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine. *European Journal of Neuroscience* 11: 1598-1604.

- ROBINSON, T.E., K.E. BROWMAN, H.S. CROMBAG & A. BADIANI (1998): Modulation of the induction or expression of psychostimulant sensitization by the circumstances surrounding drug administration. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 22: 347-354.
- ROSENBERG, S.D., W. LU, K.T. MUESER, M.K. JANKOWSKI & F. COURNOIS (2007): Correlates of adverse childhood events among adults with schizophrenia spectrum disorders. *Psychiatric Services* 58: 245-253.
- ROSOKLIJA, G., G. TOOMAYAN, S.P. ELLIS, J. KEILP, J.J. MANN, N. LATOV, A.P. HAYS & A.J. DWORK (2000): Structural abnormalities of subicular dendrites in subjects with schizophrenia and mood disorders. *Archives of General Psychiatry* 57: 349-356.
- ROSOKLIJA, G., B. MANCEVSKI, B. ILIEVSKI, T. PERERA, S.H. LISANBY, J.D. COPLAN, A. DUMA, T. SERAFIMOVA & A.J. DWORK (2003): Optimization of Golgi methods for impregnation of brain tissue from humans and monkeys. *Journal of Neuroscience Methods* 131: 1-7.
- ROWLETT, J.K., B.A. MATTINGLY & M.T. BARDO (1995): Repeated quinpirole treatment: locomotor activity, dopamine synthesis, and effects of selective dopamine antagonists. *Synapse* 20: 209-216.
- SALOMON, L., C. LANTERI, J. GLOWINSKI & J.-P. TASSIN (2006): Behavioral sensitization to amphetamine results from an uncoupling between noradrenergic and serotonergic neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 7476-7481.
- SANDERSON, T.M., M.-C. COTEL, M.J. O'NEILL, M.D. TRICKLEBANK, G.L. COLLINGRIDGE & E. SHER (2012): Alterations in hippocampal excitability, synaptic transmission and synaptic plasticity in a neurodevelopmental model of schizophrenia. *Neuropharmacology* 62: 1349-1358.
- SANFORD, J.C., F.D. SMITH & J.A. RUSSELL (1993): Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods in Enzymology* 217: 483-509.
- SARTORY, G. (2007): *Schizophrenie - Empirische Befunde und Behandlungsansätze*. Spektrum Akademischer Verlag; München.
- SCARR, E., T.F. COWIE, S. KANELAKIS, S. SUNDRAM, C. PANTELIS & B. DEAN (2009): Decreased cortical muscarinic receptors define a subgroup of subjects with schizophrenia. *Molecular Psychiatry* 14: 1017-1023.
- SCHUETZ, E., A.L. JONGEN-RÊLO, K.U. DRESCHER, G. GROSS & H. SCHOEMAKER (2004): The effect of the dopamine D₃ receptor antagonist A-437203 on the development and expression of locomotor sensitization to quinpirole in rats. 34th Annual Meeting of the Society for Neuroscience; San Diego. (Poster)
- SCHUETZ, E., A.L. JONGEN-RÊLO, K.U. DRESCHER, G. GROSS & H. SCHOEMAKER (2005): Behavioral sensitization to quinpirole in rats: no regulation of striatal dopamine D₃ receptors. 35th Annual Meeting of the Society for Neuroscience; Washington D.C. (Poster)
- SEVERANCE, E.G. & R.H. YOLKEN (2008): Novel $\alpha 7$ nicotinic receptor isoforms and deficient cholinergic transcription in schizophrenia. *Genes, Brain and Behavior* 7: 37-45.

- SHEN, H., S.R. SESACK, S. TODA & P.W. KALIVAS (2008): Automated quantification of dendritic spine density and spine head diameter in medium spiny neurons of the nucleus accumbens. *Brain Structure and Function* 213: 149-157.
- SHEN, S., B. LANG, C. NAKAMOTO, F. ZHANG, J. PU, S.-L. KUAN, C. CHATZI, S. HE, I. MACKIE, N.J. BRANDON, K.L. MARQUIS, M. DAY, O. HURKO, C.D. MCCAIG, G. RIEDEL & D. ST CLAIR (2008): Schizophrenia-related neural and behavioral phenotypes in transgenic mice expressing truncated Disc1. *The Journal of Neuroscience* 28: 10893-10904.
- SINGER, B.F., L.M. TANABE, G. GORNY, C. JAKE-MATTHEWS, Y. LI, B. KOLB & P. VEZINA (2009): Amphetamine-induced changes in dendritic morphology in rat forebrain correspond to associative drug conditioning rather than nonassociative drug sensitization. *Biological Psychiatry* 65: 835-840.
- SINGH, S.C. (1977): Ectopic neurones in the hippocampus of the postnatal rat exposed to methylazoxymethanol during foetal development. *Acta Neuropathologica (Berlin)* 40: 111-116.
- SINGH, S.C. (1980): Deformed dendrites and reduced spine numbers on ectopic neurons in the hippocampus of rats exposed to methylazoxymethanol-acetate. *Acta Neuropathologica* 49: 193-198.
- SMITH, D.L., J. POZUETA, B. GONG, O. ARANCIO & M. SHELANSKI (2009): Reversal of long-term dendritic spine alterations in Alzheimer disease models. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 106: 16877-16882.
- SOKOLOFF, P., B. GIROS, M.-P. MARTRES, M.-L. BOUTHENET & J.-C. SCHWARTZ (1990): Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D₃) as a target for neuroleptics. *Nature* 347: 146-151.
- SORRA, K.E. & K.M. HARRIS (2000): Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus* 10: 501-511.
- SOUMIYA, H., H. FUKUMITSU & S. FURUKAWA (2011): Prenatal immune challenge compromises development of upper-layer but not deeper-layer neurons of the mouse cerebral cortex. *Journal of Neuroscience Research* 89: 1342-1350.
- SPINK, A.J., R.A.J. TEGELBOSCH, M.O.S. BUMA & L.P.J.J. NOLDUS (2001): The EthoVision video tracking system - a tool for behavioral phenotyping of transgenic mice. *Physiology & Behavior* 73: 731-744.
- SPIRES, T.L., M. MEYER-LUEHMANN, E.A. STERN, P.J. MCLEAN, J. SKOCH, P.T. NGUYEN, B.J. BACSKAI & B.T. HYMAN (2005): Dendritic spine abnormalities in APP transgenic mice demonstrated by gene transfer and intravital multiphoton microscopy. *The Journal of Neuroscience* 25: 7278-7287.
- STAHL, S.M. (2013): *Stahl's essential psychopharmacology. Neuroscientific basis and practical applications*. 4th Edition; Cambridge University Press; Cambridge, New York, Melbourne, Madrid, Cape Town, Singapore, São Paulo, Delhi; Mexico City.

- STEWART, J.& A, BADIANI (1993): Tolerance and sensitization to the behavioral effects of drugs. *Behavioural Pharmacology* 4: 289-312.
- SULLIVAN, R.M., H. TALANGBAYAN, H. EINAT & H. SZECHTMAN (1998): Effects of quinpirole on central dopamine systems in sensitized and non-sensitized rats. *Neuroscience* 83: 781-789.
- SULLIVAN, P.F. (2005): The genetics of Schizophrenia. *Public Library of Science Medicine* 2: e212.
- SWERDLOW, N.R., D.L. BRAFF, N. TAAID & M.A. GEYER (1994): Assessing the validity of an animal model of deficient sensorimotor gating in schizophrenic patients. *Archives of General Psychiatry* 51: 139-154.
- SWERDLOW, N.R., D.L. BRAFF, H. HARTSTON, W. PERRY & M.A. GEYER (1996): Latent inhibition in schizophrenia. *Schizophrenia Research* 20: 91-103.
- SWEET, R.A., R.A. HENTELFF, W. ZHANG, A.R. SAMPSON & D.A. LEWIS (2009): Reduced dendritic spine density in auditory cortex of subjects with schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 34: 374-389.
- SWEET, R.A., K.N. FISH & D.A. LEWIS (2010): Mapping synaptic pathology within cerebral cortical circuits in subjects with schizophrenia. *Frontiers in Human Neuroscience* 4: 1-14.
- SZE, C.-I., J.C. TRONCOSO, C. KAWAS, P. MOUTON, D.L. PRICE & L.J. MARTIN (1997): Loss of the presynaptic vesicle protein synaptophysin in hippocampus correlates with cognitive decline in Alzheimer's disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 56: 933-944.
- TACKENBERG, C., A. GHORI & R. BRANDT (2009): Thin, stubby or mushroom: spine pathology in Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research* 6: 261-268.
- TANDON, R., M.S. KESHAVAN & H.A. NASRALLAH (2008a): Schizophrenia, "Just the facts": What we know in 2008. Part 1: Overview. *Schizophrenia Research* 100: 4-19.
- TANDON, R., M.S. KESHAVAN & H.A. NASRALLAH (2008b): Schizophrenia, "Just the facts": What we know in 2008. 2. Epidemiology and etiology. *Schizophrenia Research* 102: 1-18.
- TANDON, R., H.A. NASRALLAH & M.S. KESHAVAN (2009): Schizophrenia, "just the facts". 4. Clinical features and conceptualization. *Schizophrenia Research* 110: 1-23.
- TANDON, R. W. GAEBEL, D.M. BARCH, J. BUSTILLO, R.E. GUR, S. HECKERS, D. MALASPINA, M.J. OWEN, S. SCHULTZ, M. TSUANG, J. VAN OS & W. CARPENTER (2013): Definition and description of schizophrenia in the DSM-5. *Schizophrenia Research* 150: 3-10.
- TERRY, R.D., E. MASLIAH, D.P. SALMON, N. BUTTERS, R. DETERESA, R. HILL, L.A. HANSEN & R. KATZMAN (1991): Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Annals of Neurology* 30: 572-580.
- ÜÇÖK, A. & W. GAEBEL (2008): Side effects of atypical antipsychotics: a brief overview. *World Psychiatry* 7:58-62.

VOLK, D.W. & D.A. LEWIS (2002): Impaired prefrontal inhibition in schizophrenia: relevance for cognitive dysfunction. *Physiology & Behavior* 77: 501-505.

WALSH, R.N. & R.A. CUMMINS (1976): The open field test: a critical review. *Psychological Bulletin* 83: 482-504.

WEINBERGER, D.R., M.F. EGAN, A. BERTOLINO, J.H. CALLICOTT, V.S. MATTAY, B.K. LIPSKA, K.F. BERMAN & T.E. GOLDBERG (2001): Neurobiology of schizophrenia and the role of atypical antipsychotics. Prefrontal neurons and the genetics of Schizophrenia. *Biological Psychiatry* 50: 825-844.

WESTERMAN, M.A., D. COOPER-BLACKETER, A. MARIASH, L. KOTILINEK, T. KAWARABAYASHI, L.H. YOUNKIN, G.A. CARLSON, S.G. YOUNKIN & K.H. ASHE (2002): The relationship between A β and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience* 22: 1858-1867.

WOBROCK, T., F.-G. PAJONK & P. FALKAI (2004): Schizophrenie. Teil 1: Epidemiologie, Ätiopathogenese, Symptomatologie. *Fortschritte der Neurologie - Psychiatrie* 72: 98-113.

WOLF, M.E., S.L. DAHLIN, X.-T. HU, C.-J. XUE & K. WHITE (1995): Effects of lesions of prefrontal cortex, amygdala, or fornix on behavioral sensitization to amphetamine: comparison with N-methyl-D-aspartate antagonists. *Neuroscience* 69: 417-439.

WOLF, M.E. (1998): The role of excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychomotor stimulants. *Progress in Neurobiology* 54: 679-720.

YANG, N.-S., J. BURKHOLDER, B. ROBERTS, B. MARTINELL & D. MCCABE (1990): *In vivo* and *in vitro* gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87: 9568-9572.

ZHANG, Z.J. & G.P. REYNOLDS (2002): A selective decrease in the relative density of parvalbumin-immunoreactive neurons in the hippocampus in schizophrenia. *Schizophrenia Research* 55: 1-10.

ZITO, K. & V.N. MURTHY (2002): Dendritic spines. *Current Biology* 12: R5.

ZUCKERMAN, L., M. REHAVI, R. NACHMAN & I. WEINER (2003): Postpubertal emergence of disrupted latent inhibition, dopaminergic hyperfunction, and altered limbic morphology in the offspring: a novel neurodevelopmental model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 28: 1778-1789.

ZUCKERMAN, L. & I. WEINER (2003): Post-pubertal emergence of disrupted latent inhibition following prenatal immune activation. *Psychopharmacology* 169: 308-313.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Linda Maria Reimers, M. Sc.
Anschrift: Kleestraße 3
69469 Weinheim
Geburtsdatum, -ort: 03.10.1980, Rinteln (Niedersachsen)

Ausbildung Biowissenschaften

03/2010 - 07/2014 Promotion Dr. rer. nat.
Neuroscience Discovery Research
AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG, Ludwigshafen am Rhein
Abbott GmbH & Co. KG, Ludwigshafen am Rhein (03/2010 - 10/2012)
Dissertation: Neuronale Plastizität in Tiermodellen für neuropsychiatrische Erkrankungen
in Kollaboration mit Apl. Prof. Dr. Manuela Gernert, Stiftung Tierärztliche Hochschule
Hannover
10/2007 - 11/2009 Master of Science in Animal Biology and Biomedical Sciences
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
Master-These: Zellbasierte Behandlungsstrategien im Rattenmodell des Morbus Parkinson:
Evaluation der motorischen Integration und des psychischen Verhaltens nach intrastriärer
Transplantation mesencephaler Progenitorzellen
Institut für Neuroanatomie, Medizinische Hochschule Hannover
02/2008 Kategorie C - FELASA
10/2004 - 08/2007 Bachelor of Science in Biologie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
Bachelor-These: Etablierung immunhistochemischer Untersuchungen des Calcium-aktivierten
Kalium-Kanals SK2 im Ratten-Kindling-Modell der Temporallappenepilepsie
Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie, Stiftung Tierärztliche Hochschule
Hannover
10/2003 - 07/2004 Berufsprüfungsjahr in Chemie, Physik und Biologie
Justus-von-Liebig-Schule, Hannover

Ausbildung Finanzwesen

08/2000 - 06/2002 Ausbildung zur Bankkauffrau
Volksbank Hameln-Pyrmont eG, Hameln

Schulbildung

08/1993 - 06/2000 Abitur, Gymnasium Ernestinum, Rinteln

Berufserfahrungen

08/2006 - 09/2006 Studentische Hilfskraft
Institut für Siedlungswasserwirtschaft und Abfalltechnik, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität
Hannover
06/2002 - 10/2003 Bankkauffrau
Volksbank Hameln-Pyrmont eG

Referenzen

Dr. Corinna Klein
Neuroscience Discovery Research
AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG Knollstraße 67061 Ludwigshafen am Rhein
Prof. Dr. Manuela Gernert
Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover Bünteweg 17 30559 Hannover
Prof. Dr. Ulrich Ebert
Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG Birkendorfer Straße 65 88397 Biberach/Riss

Publikations- und Posterübersicht

Publikation

JUNGNICKEL, J., I. KALVE, L. REIMERS, A. NOBRE, M. WESEMAN, A. RATZKA, N. HALFER, C. LINDEMANN, K. SCHWABE, K. TÖLLNER, M. GERNERT & C. GROTHE (2011): Topology of intrastriatal dopaminergic grafts determines functional and emotional outcome in neurotoxin-lesioned rats. Behavioural Brain Research 216(1):129-35.

Poster

REIMERS, L., A. RELO & C. KLEIN (2013): Neuroanatomical characterization of a pharmacologically induced rodent model of schizophrenia. 10. Göttingen Meeting der Deutschen Neurowissenschaftlichen Gesellschaft, Göttingen

REIMERS, L., M. MAASLAND, B. THEOBALD, R. EICHHOFF-DIEFENBACH, A. RÊLO & C. KLEIN (2012): Neuroanatomical characterization of neurobiological, developmental models of schizophrenia. Science Day Abbott GmbH & Co. KG, Ludwigshafen

REIMERS, L., C. PEREZ-CRUZ, M. MAASLAND, U. EBERT & C. KLEIN (2011): An optimized method for quantifying dendritic spines in a murine model of Alzheimer's disease. 9. Göttingen Meeting der Deutschen Neurowissenschaftlichen Gesellschaft, Göttingen

Sonstiges (Ko-Autorin Poster)

HONNDORF, S., L. REIMERS, J.-M. FRTISCHY, M. WEIßING & M. GERNERT (2009): Investigation of the small-conductance calcium-activated potassium channel SK2 and the GABA_A receptor subunit $\alpha 1$ expression in the basal ganglia in the rat amygdala-kindling model of temporal lobe epilepsy. Jährliches Kolloquium des Zentrums für Systemische Neurowissenschaften Hannover, Braunlage

Danksagungen

An erster Stelle bedanke ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. Corinna Klein. Vielen Dank, dass du die externe Betreuung meiner Dissertation kompetent weitergeführt und dich stets für mich engagiert hast. Ich habe unsere zahlreichen angenehmen und aufschlussreichen Gespräche, unsere Offenheit sowie unser freundschaftliches Miteinander sehr geschätzt und danke dir, dass ich ein Teil deiner AG sein und Vieles (kennen-) lernen durfte.

Ausdrücklich bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Manuela Gernert für die Übernahme der universitären Betreuung und die Begleitung meiner Promotion, für den gewohnt freundlichen Kontakt und die Ermöglichung der Ergebnis-Präsentationen an der TiHo.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Mark Maasland. Ich danke dir vielmals für deinen unermüdlichen Einsatz bei der Entwicklung und Etablierung der automatisierten 2D- bzw. 3D-Spine-Analyse sowie der damit verbundenen Programmierung entsprechender Algorithmen. Danke für die geduldigen technischen Einweisungen, für die Hilfsstellungen und die immer freundliche Unterstützung wie auch nicht zuletzt für die gedanklichen „Wildlife-Ausflüge“. Ich habe dir gern zugehört und mich beeindruckt lassen.

Bei Frau Dr. Claudia Perez-Cruz bedanke ich mich für die fachkundige Einführung in die Thematik und Methodik der Gene Gun sowie die angenehme anfängliche Zusammenarbeit.

Auch bei Frau Dr. Karla Drescher und Frau Dr. Ana Relo möchte ich mich nachdrücklich für Ihre Hilfsbereitschaft, die förderlichen Gespräche sowie die konstruktive Kritik bedanken.

Weiterhin möchte ich meinen Dank Herrn Prof. Dr. Ulrich Ebert aussprechen für die Ermöglichung der externen Dissertation und die kompetente Begleitung zu Beginn meiner Arbeit.

Frau Prof. Dr. Ina Weiner und Frau Dr. Ana Basso danke ich für die Überlassung des Poly I:C- bzw. MAM-Gewebes, wodurch meine Dissertation um die Untersuchung von zwei weiteren interessanten Tiermodellen der Schizophrenie bereichert wurde.

Frau Prof. Kerstin Schwabe und Herrn Prof. Dr. Hansjörg Küster danke ich vielmals für die Übernahme von Prüferfunktion und Prüfungsvorsitz.

Außerdem danke ich

Frau Brigitte Theobald nicht nur für die fachkundige Beantwortung so mancher Frage, die routinierte Durchführung verschiedener histologischer Färbungen und die erfahrene Unterstützung insbesondere bei den Perfusionen sondern auch die Fürsorglichkeit, das Vertrauen und dafür, dass ich durch deine Initiative so viel Ruhe zum Grübeln und Schreiben im Büro hatte. Es war schön, dich als „office colleague“ zu haben und auch mal zu plaudern.

Frau Agathe Stanek für die kompetente Durchführung einiger „free floating“- und Ventana-Färbungen und dafür, dass wir uns so gut verstanden haben und ich durch dich viele schöne und unterhaltsame Mittagspausen verbringen durfte.

Frau Christine Schuster für die fachmännische Anfertigung der Mikrotomschnitte sowie zahlreiche lustige und vertraute Pausen und Gespräche.

allen anderen Kolleginnen und Kollegen des Teams für die liebe Integration in die Gruppe, den stets angenehmen Umgang, die Rücksichtnahme während meiner Schreibphase, für unzählige positive Momente und eine unvergessliche Zeit. Ich habe mich sehr wohl gefühlt bei euch.

Frau Regina Eichhoff-Diefenbach für die einführenden Erläuterungen hinsichtlich des Open Field-Tests, die immer hilfsbereite Beantwortung meiner Fragen und die kurzweiligen Erzählungen.

Mein allergrößter Dank ist meinen Eltern gewidmet. Ich danke euch von Herzen für eure Fürsorge, Mühe und Liebe, für eure immerwährende Unterstützung, das liebevolle Versorgen von Mia sowie die ausnahmslos geborgene und erholsame Zeit daheim. Danke für eure Ermutigungen, Ratschläge und Meinungen, dafür, dass ich allzeit zu euch kommen konnte bzw. kann und ihr mich in so vielen Momenten seelisch gestärkt habt. Ohne euch und eure Liebe wäre ich nicht dort, wo ich heute bin.

Mein ebenso herzlicher Dank gilt Enrico. Vielen Dank für deine Liebe, dein grenzenloses Verständnis und deine Geduld. Danke für die sofortige Hilfe bei dem einen oder anderen Computer-Problem und dafür, dass ich dich immer fragen durfte. Ich danke dir, dass du mich liebst, so wie ich bin, und stets für mich da warst. Danke, dass du mir immer zugehört hast und bemüht warst, mir den Rücken zu stärken.

Ein Dankeschön der besonderen Weise gilt M. Danke, dass du so bist, wie du bist, mich nie vergessen und auf deine ganz spezielle Art stets unterstützt hast.